



**Ana Maria
Pina Cabral**

Descritores Biológicos num Gradiente de Enriquecimento Orgânico

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Victor Manuel Santos Quintino, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e sob a co-orientação científica, do Professor Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Helena Ferrão Ribeiro da Costa
Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Professor Doutor Victor Manuel dos Santos Quintino
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Professor Doutor Victor Quintino pela orientação e apoio dispensados durante a realização do presente trabalho, sem os quais este não teria sido possível.

Ao Professor Doutor Miguez, pelo continuo apoio e incentivo, com que co-orientou esta dissertação.

Aos dois Professores Doutores devo ainda agradecer o facto de acreditarem e apoiarem incondicionalmente este meu trabalho, apesar das minhas evidentes dificuldades numa área, que em muito se afasta da minha formação de base.

À SANEST, S.A., pela possibilidade de me integrar na campanha de amostragem realizada em Julho de 2005, no âmbito do estudo da Monitorização Ambiental da Componente Sedimentar associada ao funcionamento do Emissário Submarino da Guia.

Nunca poderei esquecer todos aqueles colegas que me ajudaram neste longo percurso:

À Joana, à Rosa e ao Leandro pela persistência e ânimo com que sempre me brindaram, mesmo nas mais desesperantes horas na identificação da macrofauna bentónica;

À Cati, pela paciência e ajuda, perante a minha imensa dificuldade à lupa e, perante o súbito desfecho dos ensaios;

À Milene, pela plena disponibilidade que manifestou em me ajudar na observação dos *Nassarius reticulatus* em tempo record e, para a realização de análises químicas;

À Susana por ter suportado as minhas imensas dúvidas;

Ao “Pituxa” pela inquantificável ajuda nos trabalhos de campo e na manutenção dos animais em laboratório, face os meus atribulados horários de trabalho.

Aos meus AMIGOS, aos meus eternos AMIGOS, um sentido bem hajam por serem quem são e da forma que são.

À minha família, que tão bem soube suportar as minhas constantes ausências, rabugices e cansaços.

palavras-chave

Descritores Biológicos, Imposex, *Nassarius reticulatus*, Disruptores Endócrinos, Compostos com Actividade Estrogénica, Efluentes Domésticos.

resumo

Este estudo teve como objectivo avaliar os efeitos do efluente de origem doméstica eliminado através do emissário submarino da Guia no ambiente marinho receptor. Foram recolhidas, em Julho de 2005, amostras em três locais (L1, L2 e L3) na vizinhança do emissário submarino, para a caracterização físico-química dos sedimentos e para o estudo da estrutura da comunidade macrobentónica. L1 localiza-se entre os dois ramos do emissário perto da área de difusão do efluente, enquanto que L2 e L3 distam daquele em 2 e 3 km, respectivamente.

Verificou-se que os sedimentos superficiais da área de estudo são de areia fina com um baixo conteúdo em finos e sem sinais de ocorrer a acumulação de sólidos voláteis totais na zona de difusão dos efluentes. O valor mais baixo de Eh (-28mV) foi determinado no local de amostragem mais próximo dos difusores (L1).

Na caracterização da macrofauna bentónica foram recolhidas, no conjunto dos três locais de amostragem, 122 espécies e cerca de 5800 indivíduos que apresentaram uma biomassa total de cerca de 220g. Verificou-se que a abundância e a biomassa decresceram com a distância ao emissário enquanto que a riqueza em espécies e o índice de diversidade de Shannon-Wiener aumentaram neste sentido. Em L1 dominaram em termos de abundância e de biomassa espécies oportunistas (*Capitella spp.* e *Nassarius reticulatus*, respectivamente) que contribuíram em mais de 70% para a abundância e em mais de 48% para a biomassa daquele local. A abundância destas espécies diminuiu com a distância ao emissário sendo em L3 o complexo *Capitella spp.* substituído por *Hyalinoecia bilineata* considerada uma espécie típica daquela zona costeira. Também as curvas de dominância da abundância e da biomassa (curvas ABC) sugerem a presença de uma comunidade macrobentónica moderadamente perturbada em L1 diminuindo a evidência da perturbação à medida que a distância ao emissário aumenta. Estes resultados suportam a hipótese de que a perturbação desta comunidade se deve ao enriquecimento orgânico associado ao funcionamento do emissário submarino.

Nos mesmos locais de amostragem determinaram-se os níveis de imposex em *Nassarius reticulatus*. Não se observaram diferenças significativas entre os valores de comprimento de pénis (FPL) e de comprimento relativo de pénis (RPLI) nos três locais de amostragem, os quais variaram entre 0,093 e 0,124 e, entre 0,871 e 1,202, respectivamente. No entanto, verificou-se que o índice de sequência do vaso deferente (VDSI) e a percentagem de fêmeas afectadas por imposex % I aumentaram significativamente com a distância ao

emissário (ANOVA: $F= 34.9$; $P < 0.001$ para VDSI; $F= 40,4$; $P < 0,001$ para % I). O VDSI variou entre 0,418 e 0,842 enquanto que a % I variou entre 40,53 e 70,25%.

Colocou-se a hipótese de que o gradiente de intensidade de imposex acima descrito se poderia dever à acção de compostos estrogénicos eventualmente presentes no efluente. Para testar esta hipótese realizaram-se ensaios laboratoriais para avaliar o efeito de uma mistura de compostos com actividade estrogénica (MCAE), geralmente presentes em águas residuais domésticas, no desenvolvimento de imposex. Para tal, expuseram-se fêmeas de *N. reticulatus* a tributilestanho (TBT) e a TBT (250 ng Sn-TBT/L) com concentrações crescentes de MCAE (composta por 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estrona e nonilfenol). Verificou-se, conforme esperado, que o TBT induz o desenvolvimento de imposex em todos os tratamentos em que foi introduzido mas não houve alterações significativas nos níveis daquele parâmetro na presença de MCAE, indicando que aqueles compostos estrogénicos, nas condições experimentais utilizadas, não interferem no desenvolvimento de imposex.

keywords

Biological variables, Imposex, *Nassarius reticulatus*, endocrine disruptors, estrogenic chemicals, sewage effluent.

abstract

This study aims to assess the effects of screened but untreated sewage from a major city, discharged to the marine environment via an offshore outfall (Guia). In July 2005, samples from three sites (L1, L2 and L3) were taken for the sediment physical and chemical characteristics study and for the benthic community structure study. L1 is located between the branches of the outfall in the discharge area, and L2 and L3 are, respectively, 2 and 3 km distant from L1.

The superficial sediments in the study area were composed of fine sand with a low content of particles with less than 63 μm and without signs of volatile solids accumulation close to the outfall. The lowest Eh value (-28mV) was observed at the vicinity of the diffusers (L1).

A total of 122 species, representing around 5800 specimens with a total wet weight biomass of 220g, were identified in the three sites. It was observed that abundance and biomass decreased with the distance to the outfall while species richness and Shannon-Wiener diversity index increased. Opportunist species dominated in abundance (*Capitella spp.*) and biomass (*Nassarius reticulatus*) in L1, contributing to more than 70% of the total abundance and to more than 48% of the total biomass, respectively. The abundance of those taxa decreased with the distance to the outfall being the complex *Capitella spp.* absent at L3 site and replaced by *Hyalinoecia bilineata*. The Abundance/Biomass comparison (ABC) curves also indicate that the macrobenthic community was moderately disturbed in L1. The results support the hypothesis of community disturbance due to organic enrichment related to the operation of the outfall.

Imposex was assessed in *Nassarius reticulatus* populations in the same sampling sites. There were no significant differences in female penis length (FPL) and relative penis length index (RPLI), which varied between 0,093 and 0,124 and, between 0,871 and 1,202, respectively. However, the vas deferens sequence index (VDSI) and the percentage of females affected with imposex (% I) increased significantly with the distance to the outfall (ANOVA: $F= 34.9$; $P < 0.001$ for VDSI; $F= 40.4$; $P < 0.001$ for % I): the VDSI ranged from 0,418 to 0,842 and % I varied from 40,53 to 70,25%.

In an attempt to evaluate if a mixture of estrogenic active chemicals (MCAE), at environmentally relevant concentrations, could cause a reduction of imposex development under laboratory conditions, we have tested if exposure

to a mixture of 17 β -estradiol, 17 α - ethinylestradiol, estrone and nonylphenol could ameliorated the severity of imposex induced by tributyltin (TBT) in *Nassarius reticulatus*. After 30 days of exposure, results demonstrated a significant increase in FPL in all treatments where TBT (250 ng Sn-TBT/L) was present. However, the addition of MCAE to TBT had no significant effects on the development of imposex suggesting that these estrogenic compounds may have no influence on imposex expression in this specie.

Índice de Figuras

Figura 1 – <i>Nassarius reticulatus</i> (Linné, 1758) aspecto geral da concha, adaptado de Graham 1988.....	10
Figura 2 – Navio do Instituto Hidrográfico “N. R. P. Auriga”, a bordo do qual decorreu a amostragem de sedimentos e organismos.....	14
Figura 3 – Posicionamento dos locais de amostragem L1, L2 e L3, relativamente aos dois ramos do emissário submarino.....	15
Figura 4 – Recolha de amostras de sedimento com o amostrador Smith-McIntyre.	15
Figura 5 – Processamento das amostras destinadas ao estudo da macrofauna bentónica....	16
Figura 6 – Esquema da evolução do imposex (tipo a) com os diferentes estádios VDS Adaptado de Stroben <i>et al.</i> (1992a).....	23
Figura 7 – Representação, em cada local de amostragem, da espécie com maior abundância (rosa) e biomassa (preto) (expresso em gramas de peso fresco).....	33
Figura 8 – Curvas de dominância da abundância para os três locais de amostragem (referentes à área de amostragem de 0,1m ²).....	37
Figura 9 – Curvas comparativas da dominância da abundância e biomassa (curvas ABC) para cada local de amostragem (referentes à área de amostragem de 0,1m ²).....	38
Figura 10 – Valores de VDSI (A), % I (B), FPL (C – valores expressos em mm) e RPLI (D) observados em <i>Nassarius reticulatus</i> em cada local de amostragem.	40
Figura 11 – Valor de VDSI (A), de % I (B), de FPL (C), de RPLI (D) em cada local de amostragem.	42
Figura 12 – Valores médios do comprimento de pénis (FPL) para os tratamentos Controlo, Controlo de Solvente, TBT (250 ng Sn-TBT/L) e soluções de TBT (250 ng Sn-TBT/L) com adição da mistura de compostos com actividade estrogénica (MCAE 12,5%, MCAE 25% e MCAE 50%).....	45

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição granulométrica dos sedimentos superficiais recolhidos nos locais L1, L2 e L3.....	29
Tabela 2 – Teor em Finos, teor em sólidos voláteis totais e potencial de oxidação-redução (mV), para cada local de amostragem.....	30
Tabela 3 – Riqueza em espécies, abundância total e biomassa total (expressa em gramas de peso fresco) para cada um dos grupos taxonómicos encontrados durante a campanha de amostragem na Guia em Julho de 2005 (dados referentes à amostra compósita correspondente a uma área de amostragem de 0,4m ²).....	30
Tabela 4 – Representação das espécies que apresentam biomassa superior a 1% da biomassa total (valores relativos à amostra compósita por local de amostragem correspondente a uma área de amostragem de 0,4m ²).....	34
Tabela 5 – Representação das espécies que apresentam abundância superior a 2% em cada local de amostragem (valores relativos à amostra compósita por local de amostragem correspondente a uma área de amostragem de 0,4m ²).....	35
Tabela 6 – Valores de Abundância (A), Biomassa (B), Riqueza em Espécies (S), Diversidade em espécies relativamente à abundância (H'), abundância média por espécie (A/S) e biomassa média por indivíduo (B/A), para cada local de amostragem (dados referentes ao valor médio de 4 réplicas por local de amostragem, ou seja, correspondente a uma área de amostragem de 0,1m ²).....	36
Tabela 7 – Valores médios de comprimento de pénis dos machos (PL) e respectivos desvios padrão observados em cada local de amostragem (valores expressos em mm).	41
Tabela 8 – Valores médios de altura de concha, VDSI e FPL, e respectivos desvios padrão (s), de fêmeas recolhidas na Ria de Aveiro para inclusão na experiência.	43
Tabela 9 – Valores médios de VDSI e de FPL obtidos ao fim de 30 dias de exposição nos diferentes tratamentos: C – Controlo; CS – Controlo de Solvente; TBT (250 ng Sn-TBT/L); TBT+ MCAE 12,5%; TBT+ MCAE 25%; TBT+ MCAE 50%.....	44

Índice

1 - Introdução.....	1
2 - Âmbito do trabalho	12
3- Materiais e Métodos.....	14
3.1 - Amostragem.....	14
3.2 – Caracterização Físico-Química do sedimento	17
Granulometria	17
Sólidos Voláteis Totais.....	17
Potencial de oxidação-redução	17
3.3 - Comunidades de macrofauna bentónica.....	18
Variáveis biológicas primárias e diversidade específica.....	18
3.4 – Avaliação dos níveis de imposex de <i>Nassarius reticulatus</i> na área de estudo	22
3.5 - Avaliação do efeito de uma mistura de compostos com actividade estrogénica e do TBT na indução de imposex em <i>Nassarius reticulatus</i>	25
4 - Resultados	29
4.1 – Caracterização Físico-Química do sedimento	29
4.2 - Comunidades de macrofauna bentónica.....	30
4.3 – Avaliação dos níveis de imposex em <i>Nassarius reticulatus</i> na área de estudo	39
4.4 - Avaliação do efeito de uma mistura de compostos com actividade estrogénica e do TBT na indução de imposex em <i>Nassarius reticulatus</i>	43
5 – Discussão	47
6 - Bibliografia.....	56

1 - Introdução

A água é o recurso mais abundante à superfície da Terra ocupando 71% da sua área. Incolor, inodora, transparente e insípida, é um composto químico imprescindível para a vida e representa um suporte essencial dos ecossistemas. No entanto, as actividades humanas influenciam cada vez mais o ciclo da água (Kolpin *et al.*, 2002) e desde a revolução industrial do século XIX a poluição deste recurso natural foi aumentando, tornando-se essencial proteger os seus reservatórios e fontes (Desbrow *et al.*, 1998). Estima-se que existam, provavelmente, cerca de 60 000 contaminantes orgânicos em águas doces e pelo menos o mesmo número em sistemas aquáticos marinhos. Estes compostos têm origem em descargas de efluentes industriais, domésticos, agrícolas e podem também surgir de lixiviações a partir de depósitos de resíduos sólidos, águas contaminadas, incineração, tráfego aquático ou descargas acidentais (DeFur *et al.*, 1999).

Os oceanos apresentam, geralmente, uma extensa capacidade de assimiliação e são por isso vulgarmente utilizados como meio receptor na eliminação de efluentes (Metcalf & Eddy, 1991). Os emissários submarinos constituem uma forma de transportar águas residuais domésticas e/ou industriais para zonas mais afastadas da costa, diminuindo potencialmente a perturbação de sistemas de reconhecida sensibilidade e importância como as zonas estuarinas e locais de lazer junto à linha de costa. Em Portugal, o Decreto de Lei n.º 152/97, de 19 de Junho, permite as descargas de efluentes urbanos não sujeitos a tratamento secundário em áreas costeiras classificadas como menos sensíveis, desde que haja uma actividade de monitorização ambiental.

Os estudos de monitorização ambiental associados a emissários submarinos incluem vulgarmente uma componente de avaliação da qualidade dos sedimentos superficiais, uma vez que estes poderão funcionar como reservatório de contaminantes persistentes (Power *et al.*, 1991; Lamberson *et al.*, 1992), com concentrações várias vezes superiores às existentes na coluna de água (Chapman, 1986) e, por isso, os impactos poderão aqui surgir antes de ocorrerem manifestações ao nível da coluna de água (Chapman *et al.*, 1996). No entanto, a análise da qualidade de sedimentos recorrendo apenas a dados de natureza química poderão fornecer informação limitada ou sem capacidade de evidenciar perturbações biológicas que poderão ocorrer devido à contaminação (Long and Chapman, 1985). Em estudos de qualidade sedimentar, para além

de se determinar o grau de contaminação química dos sedimentos, são também utilizados métodos para avaliação de efeitos biológicos. Com este objectivo, podem ser realizados estudos relacionados com a estrutura das comunidades residentes, testes de toxicidade sedimentar, análise química de tecidos e estudos patológicos em organismos residentes. Apesar da importância da informação que cada um destes componentes fornece, a complexidade e a dinâmica do ambiente não permitem que nenhum deles, por si só, forneça uma informação completa. Os estudos integrados revelam-se, desta forma, de grande utilidade para definir a qualidade dos sedimentos superficiais (Chapman, 1992).

A avaliação da composição e da estrutura das comunidades residentes, nomeadamente da macrofauna bentónica, constitui uma forma de obter informação acerca de efeitos de contaminantes em sistemas aquáticos. As comunidades bentónicas são particularmente sensíveis aos contaminantes dos sedimentos e, pelas suas características, constituem um dos elementos do ecossistema com maior interesse para a concretização daquele objectivo, uma vez que:

- são importantes no funcionamento de ecossistemas aquáticos e na cadeia alimentar para níveis tróficos superiores;
- estabelecem uma estreita relação com o sedimento e apresentam uma intervenção activa nos processos sedimentares, como por exemplo a oxigenação;
- apresentam, na maioria das espécies, uma elevada longevidade e um estilo de vida sedentário;
- apresentam uma elevada sensibilidade a influências antropogénicas, como é o caso do enriquecimento orgânico;
- permitem a obtenção de amostras quantitativas;
- existe, actualmente, um vasto conhecimento sobre a biologia das espécies (Clarke & Warwick, 1994; Ingersoll *et al.*, 1997).

As alterações na composição e na estrutura das comunidades de um determinado local estão associadas à diferente sensibilidade das espécies perante os contaminantes. As espécies com maior sensibilidade poderão ser afectadas não só por contaminantes de efeito agudo que induzem mortalidades elevadas (originando frequentemente o desaparecimento de espécies), como por contaminantes de efeito crónico capazes de induzir perturbações na capacidade de alimentação, no recrutamento, no crescimento, na fertilidade e/ou em outros processos fisiológicos dos organismos. As populações das espécies tolerantes permanecem

normalmente inalteradas e, nos casos em que a perturbação do meio se deve à presença de uma fonte de enriquecimento orgânico, algumas espécies podem mostrar um aumento significativo da sua abundância (ex. *Capitella spp.*) por beneficiarem do estado de contaminação (Warwick *et al.*, 1994; Macleod *et al.*, 2004).

Uma das grandes causas de poluição dos ambientes aquáticos é o enriquecimento orgânico (Litle, 2000). Por esta razão, muitos dos estudos realizados sobre os efeitos biológicos de poluentes incidem na avaliação/diagnóstico e monitorização dos efeitos desse enriquecimento orgânico a longo prazo na estrutura das comunidades. Com esse intuito procede-se à análise de diferentes variáveis biológicas como as variações da riqueza específica (S - número total de espécies presentes), da abundância em indivíduos (A – quantidade de indivíduos presentes em cada espécie identificada), da biomassa (B – massa total dos indivíduos de cada espécie identificada), a abundância por espécie (A/S) e a biomassa por indivíduo (B/A), à identificação de espécies indicadoras e ao estudo dos modelos de estrutura de comunidade baseados na distribuição da abundância e/ou biomassa de determinadas espécies (Clarke & Warwick, 1994).

Para além de poderem constituir uma fonte de enriquecimento orgânico de ambientes aquáticos, os efluentes domésticos são ainda responsáveis pela entrada de compostos farmacêuticos no meio ambiente (van der Ven *et al.*, 2006). Estes têm-se tornado cada vez mais importantes como potenciais contaminantes ambientais devido não só à ampla distribuição que apresentam nos sistemas aquáticos mas ainda, por apresentarem mecanismos de acção específicos, tornando-os eficazes mesmo em baixas concentrações (Fent *et al.*, 2006; van der Ven *et al.*, 2006). Devido à sua ocorrência no meio ambiente e à sua actividade biológica intrínseca, os compostos farmacêuticos de uso humano têm sido alvos de crescente atenção por parte de entidades responsáveis pela Qualidade Ambiental e de Saúde Pública (van der Ven *et al.*, 2006). Os compostos farmacêuticos que potencialmente são capazes de alterar o normal funcionamento do sistema endócrino bem como o estado fisiológico dos animais têm-se revelado uma crescente fonte de preocupação (Kolpin *et al.*, 2002). Uma outra fonte de preocupação surge ainda do facto de muitos fármacos não serem completamente metabolizados pelos humanos ou pelos animais, podendo por isso ser rejeitados para o meio ambiente quer na forma original quer na forma de metabolitos (activos ou não). Os fármacos e os seus metabolitos poderão apresentar elevada persistência nos meios aquáticos e, apesar de serem amplamente detectados, existe

pouca informação sobre o seu transporte e destino nos sistemas aquíferos (Lorphensri *et al.*, 2006).

Um disruptor endócrino é uma substância exógena que provoca efeitos adversos na saúde de um organismo intacto, ou na sua descendência, como consequência de alterações na sua função endócrina. Um potencial disruptor endócrino é uma substância que possui propriedades que podem conduzir a disrupção endócrina num organismo intacto (DeFur *et al.*, 1999). Uma outra definição descreve os disruptores endócrinos como agentes exógenos que interferem com a produção, libertação, transporte, metabolismo, ligação, actividade ou eliminação das hormonas naturais responsáveis pela manutenção da homeostase e pela regulação de processos vitais do organismo (Kavioc, 1999).

Existe, actualmente, uma extensa lista de compostos químicos que parecem ser capazes de provocar disrupção nos sistemas endócrinos dos animais. Entre eles encontramos, por exemplo, estrogénios ambientais (compostos bifenólicos), dioxinas, pesticidas (DDT, endossulfão), metais pesados (ex. cádmio) (Deplegdge *et al.*, 1999). Alguns destes compostos sintéticos, como por exemplo, o bisfenol A e o nonilfenol (bifenis policlorados) apresentam um anel fenólico que se assemelha ao anel A das hormonas esteróides podendo actuar como agonistas ou antagonistas dos receptores de estrogénios. Embora a afinidade destes compostos àquele receptor seja relativamente baixa, a sua ampla distribuição, persistência no meio ambiente e a bioacumulação nos organismos, suscitaram preocupação quanto à sua potencial toxicidade para os seres vivos (Hardman & Gilman, 2003). De facto, o nonilfenol, um produto de degradação de surfactantes etoxilados de alquilfenóis usados na formulação de uma grande variedade de lubrificantes, detergentes, pesticidas e resinas (Tolls *et al.*, 1994), exhibe a capacidade de se ligar completamente ao receptor de estrogénios humano e, conseqüentemente, de alterar o sistema de regulação hormonal em mamíferos, peixes e invertebrados (Soto *et al.*, 1991; Tabira *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2002; Staples *et al.*, 2004).

Após a detecção destes produtos químicos no meio ambiente, tornou-se evidente a ligação da contaminação de ambientes aquáticos com uma grande variedade de anomalias no crescimento e reprodução em algumas espécies (Desbrow *et al.*, 1998), existindo evidências de que uma grande variedade de químicos com origem antropogénica apresenta propriedades e mecanismos de acção semelhantes a hormonas endógenas (Örn *et al.*, 2003). Os distúrbios hormonais observados em várias espécies selvagens incluem desde alterações

de sexo em peixes e em gastrópodes, a alterações na capacidade reprodutiva de aves e anomalias em órgãos reprodutores de crocodilos e ursos polares (Depledge *et al.*, 1999). Por outro lado, o aumento do número de casos de cancro hormono-dependentes e a diminuição da quantidade e qualidade dos gâmetas sexuais nos humanos levantaram suspeitas sobre o papel desses compostos nestes problemas (Kolpin *et al.*, 2002).

As hormonas esteróides naturais são um grupo de compostos biologicamente activos sintetizados a partir do colesterol e que apresentam em comum um anel ciclopentano-o-perhidrofenantereno. São produzidos pelo córtex adrenal, testículos, ovários e placenta nos vertebrados e incluem progestogénios, glucocorticóides, mineralocorticóides, androgénios e estrogénios. Os estrogénios (estradiol, estrona e estriol) são predominantemente hormonas femininas e vitais para a manutenção da homeostase dos tecidos reprodutivos, pele e cérebro (Hardman & Gilman, 2003). Nos mamíferos, os estrogénios sofrem várias transformações, principalmente a nível hepático. São frequentemente oxidados, hidrolisados e metilados antes da conjugação final com ácido glucurónico sendo excretados maioritariamente na forma de conjugados polares inactivos. Por exemplo, o 17 β -estradiol é rapidamente oxidado em estrona que pode ser convertido em estriol, o principal produto de excreção. O 17 α -etinilestradiol, um estrogénio sintético vulgarmente encontrado na composição de anticoncepcionais orais, é eliminado principalmente na forma conjugada com ácido glucurónico ou com arilsulfatos (Hardman & Gilman, 2003). A questão que se levanta é se estes conjugados dos estrogénios naturais e sintéticos inactivos podem ser convertidos nas formas activas, através da actividade enzimática de β -glucuronidases no meio ambiente ou nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR), aumentando a concentração ambiental destes. Esta hipótese é suportada pela detecção de vários estrogénios na forma não conjugada como o 17 β -estradiol, a estrona, o 16 α -hidroxiestrona e o 17 α -etinilestradiol em efluentes de ETARs e em águas superficiais (Desbrow *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1999; Ternes *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2004).

Apesar de ser conhecido o efeito estrogénico de muitos compostos químicos, resistem dúvidas sobre se as concentrações em que eles se encontram no meio ambiente são suficientes para causar efeitos fisiológicos adversos nos indivíduos expostos (Kolpin *et al.*, 2002). Sabe-se que alguns destes compostos conseguem exercer efeito sobre o sistema endócrino de determinados seres vivos mesmo quando presentes no meio aquático em concentrações bastante baixas. Por isso, é essencial a quantificação de hormonas esteróides

sexuais e seus compostos sintéticos similares na água ou em efluentes domésticos. No entanto, isto constitui um desafio analítico devido não só à complexidade da matriz, a qual poderá apresentar inúmeros compostos interferentes na análise dos analitos alvo, mas também devido aos baixos limites de detecção necessários para a sua determinação ($\sim 1\text{ng/L}$). Assim, para a determinação de esteróides sexuais naturais e sintéticos em amostras de água são necessárias técnicas analíticas de elevada precisão e exactidão que se tornam bastante complexas e demoradas (Alda & Barceló, 2001).

No anexo 1 encontra-se uma tabela com uma revisão bibliográfica sobre concentrações de estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, estriol, e nonilfenol presentes em influentes (águas residuais que entram na ETAR através dos sistemas colectores), efluentes (águas residuais resultantes dos tratamentos dos influentes ao nível da ETAR) ou em águas de rio.

Na investigação de compostos com actividade estrogénica presentes em efluentes de ETARs e seus potenciais efeitos em indivíduos de várias espécies a eles expostos (Desbrow *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2003; Solé *et al.*, 2003; Nakari, 2004; Quinn *et al.*, 2004), verificou-se que a fracção com maior actividade estrogénica (identificada por bio-ensaio com uma levedura que expressa o receptor de estrogénios humano) co-eluiu com os padrões de 17α -etinilestradiol (Desbrow *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2004), de 17β -estradiol (Desbrow *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2004), de bisfenol A (Larsson *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2004) e de estrona (Desbrow *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem que poderão ser estes compostos os responsáveis pela actividade estrogénica observada para os efluentes de ETARs (Desbrow *et al.*, 1998; Quinn *et al.*, 2004). Os que suscitam maior interesse no ambiente aquático, devido ao seu potencial como disruptores endócrinos são a estrona, o 17β -estradiol, o estriol e o 17α -etinilestradiol (Ying *et al.*, 2002).

Com o intuito de avaliar o risco da exposição dos indivíduos a este tipo de compostos, são inúmeros os estudos desenvolvidos nesta área. Os compostos estrogénicos são conhecidos por provocarem um grande número de efeitos em peixes: alteração no controlo da síntese de vitelogenina (Larsson *et al.*, 1999; Halm *et al.*, 2002; Solé *et al.*, 2002; Örn *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2003; Solé *et al.*, 2003; Nakari, 2004; Versonnen & Janssen, 2004), na produção do invólucro proteico de vitelina, na diferenciação de gónadas (Halm *et al.*, 2002; Kinnberg *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2003), no desenvolvimento de

caracteres sexuais secundários, estando descritas alterações na relação entre o número de indivíduos de cada sexo, favorável às fêmeas, ou até uma total reversão de sexo (Örn *et al.*, 2003; Nakari, 2004; Park *et al.*, 2004), na secreção de gonadotropina, na síntese de receptores estrogénicos, na comunicação feromonal, na formação óssea e na homeostase do cálcio (Larsson *et al.*, 1999).

A detecção de efeitos em organismos expostos prende-se não só com a concentração em que esses compostos se encontram no meio aquático mas também com a sensibilidade da espécie e, sobretudo, com a fase do ciclo de vida em que ocorre a exposição. A exposição a este grupo de compostos em fases precoces do desenvolvimento, poderá conduzir nos machos a uma alteração das suas gónadas, impossibilitando a produção de gâmetas viáveis, e nas fêmeas, alteração na sua homeostasia hormonal a qual se poderá traduzir numa diminuição de fertilidade.

Algumas Agências Reguladoras em vários países da Europa discutem, actualmente, planos para a implementação de programas de avaliação de disrupção endócrina em organismos aquáticos, os quais poderão utilizar peixes e/ou invertebrados como espécies sentinela. Define-se como espécies sentinela aquelas que, em virtude das suas características fisiológicas e comportamentais únicas, ou devido ao seu posicionamento na cadeia alimentar, são as primeiras a responder a agentes de stress presentes no ambiente (Kaviock *et al.*, 1999). Com a implementação destes programas pretende-se, por um lado, avaliar a existência de alteração na capacidade reprodutiva dos organismos aquáticos e, por outro lado, procurar e identificar possíveis causas e impactos nas populações alvo (DeFur *et al.*, 1999).

São vários os estudos que evidenciam respostas biológicas em vertebrados aquáticos face à exposição a disruptores endócrinos, no entanto, poucos são os estudos conduzidos em invertebrados apesar da sua importância ecológica (estes constituem cerca de 95 a 98% do total de espécies animais conhecidas). Esta situação poderá dever-se ao limitado conhecimento quanto à sua endocrinologia sabendo-se, contudo, que muitas das espécies de invertebrados estudadas possuem, em quantidades mensuráveis, uma complexa mistura de compostos relativamente semelhantes às hormonas encontradas nos vertebrados e, que alguns contaminantes ambientais podem causar efeitos no sistema endócrino de invertebrados através de um de três mecanismos possíveis: por actuarem como agonistas ou como antagonistas de hormonas, por interferirem com processos bioquímicos

associados à produção, disponibilidade ou metabolismo de hormonas, ou por modulação dos seus receptores (DeFur *et al.*, 1999).

O número limitado de estudos de disrupção endócrina conduzidos em invertebrados conhece uma excepção no que se refere ao estudo dos efeitos do tributilestanho (TBT) e outros compostos organoestânicos em gastrópodes (Matthiessen & Gibbs, 1998; Hutchinson, 2002; Quinn *et al.*, 2004). A presença de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de prosobrânquios foi pela primeira vez descrita por Blaber (1970) em *Nucella lapillus* e, um ano mais tarde, Smith (1971) observou o mesmo em fêmeas de *Nassarius obsoleta* e designou este fenómeno de “*imposex*”¹.

Os efeitos do TBT em gastrópodes constituem o exemplo mais ilustrativo dos efeitos de um composto disruptor endócrino sobre invertebrados marinhos. A grande utilização de tintas com este tipo de composto em embarcações, associado à sua degradação lenta e limitada, conduziram a concentrações de TBT ecologicamente relevantes nos sistemas aquáticos. Estão descritos efeitos crónicos do TBT sobre gastrópodes para concentrações que variam entre os 0,1 e os 10ng/L e, ao longo das últimas décadas, numerosos estudos revelaram a presença de imposex em mais de 150 espécies de gastrópodes mesmo perante baixas concentrações ambientais de TBT (DeFur *et al.*, 1999).

O mecanismo através do qual o TBT induz imposex continua sob investigação. Ao nível molecular, o TBT interfere com o metabolismo de hormonas, aumentando os níveis de androgénios (DeFur *et al.*, 1999), nomeadamente, de testosterona (Hutchinson, 2002). Não se conhecem ainda com pormenor os mecanismos de acção do TBT ao nível do metabolismo da testosterona, contudo, algumas evidências sugerem que aquele composto interfere na produção e/ou na eliminação de testosterona (DeFur *et al.*, 1999; Depledge *et al.*, 1999; Oberdörster & McClellan-Green, 2002). Foi proposto que o aumento dos níveis de testosterona em *Nucella* após exposição a TBT se deve à inibição competitiva da enzima aromatase CYP 19, a qual é responsável pela conversão metabólica de testosterona em 17 β -estradiol (DeFur *et al.*, 1999, Depledge *et al.*, 1999; Heidrich *et al.*, 2001; Hutchinson, 2002; Oberdörster & McClellan-Green, 2002). Uma outra hipótese explicativa para o aumento dos níveis de testosterona em *Littorina littorea* expostos a TBT parece envolver a inibição da conjugação da testosterona com grupos sulfato (DeFur *et al.*, 1999)

¹ O termo em inglês “*imposex*” introduzido por Smith (1971) refere-se à imposição de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de prosobrânquios e será a partir deste momento apenas referido como imposex.

e em resultado, a diminuição da eliminação do referido esteróide (DeFur *et al.*, 1999; Hutchinson, 2002). Em 1983, Feral & Le Gall apresentaram uma nova teoria para o mecanismo de acção do TBT no desenvolvimento de imposex, na qual defendem que o TBT actua directamente nas neuro-hormonas que controlam o desenvolvimento sexual e a reprodução, ao suprimir a libertação de um factor neuroendócrino a partir do gânglio cerebropleural. Surgem então estudos que propõem que o TBT actua como neurotoxina provocando a libertação anormal do neuropeptídeo PMF (factor morfogenético do pénis), o qual conduz ao desenvolvimento inicial dos órgãos sexuais acessórios: ducto espermático, vesícula seminal e pénis que, por sua vez, libertam androgénios. Assim, o TBT actuará ao nível do sistema nervoso e os esteróides actuam no mecanismo de feedback positivo que mantém os órgãos sexuais acessórios. O neuropeptídeo APGWamide é proposto por estes autores como o potencial candidato a PMF (Oberdörster & McClellan-Green, 2002).

O imposex é um biomarcador específico da poluição por TBT manifestando-se como uma reposta desenvolvida ao longo de toda a vida do animal dependente da dose, permitindo uma indicação bastante robusta dos níveis globais de compostos organoestânicos num dado local (Rato *et al.*, 2006).

A biomonitorização da poluição por TBT utilizando o gastrópode *Nassarius reticulatus* (Linné, 1758) surgiu da necessidade de encontrar uma espécie com uma vasta distribuição geográfica, tolerante a baixas salinidades e menos sensível que a espécie tradicionalmente utilizada (*Nucella lapillus*), permitindo a monitorização de zonas moderadamente a muito poluídas. Stroben *et al.* (1992a) foram os primeiros autores a propor esta espécie como bioindicadora da poluição por TBT e, ao longo das duas últimas décadas, vários autores utilizaram esta espécie para a biomonitorização de sistemas estuarinos e costeiros (Stroben *et al.*, 1992b; Barroso & Moreira, 2002; Santos *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2005; Rato *et al.*, 2006). De facto, vários estudos de campo e laboratoriais evidenciam correlações significativas entre o imposex e a concentração de TBT nos tecidos das fêmeas daquele gastrópode pelo que esta espécie se encontra validada como espécie bioindicadora da poluição ambiental por tributilestanho (Stroben *et al.*, 1992a; Barroso *et al.*, 2000; Barreiro *et al.*, 2001; Barroso *et al.*, 2002; Barroso & Moreira, 2002; Sousa *et al.*, 2005).

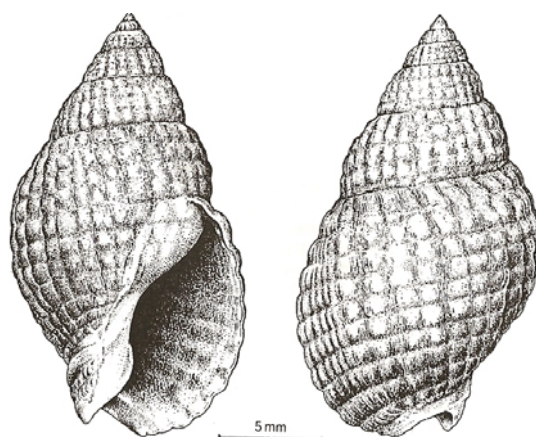


Figura 1 – *Nassarius reticulatus* (Linné, 1758) aspecto geral da concha, adaptado de Graham 1988.

N. reticulatus (figura 1) é um gastrópode marinho da subclasse dos prosobrânquios com uma ampla distribuição geográfica que se estende desde as Canárias e Açores até ao Norte da Noruega e em todo o mar Negro e Mediterrâneo (Fretter & Graham, 1984). Esta espécie é também conhecida por *Buccinum reticulatum*, *Nassa reticulata* ou por *Hinia reticulata*. Apresenta aproximadamente 25 a 35 mm de altura máxima e 14 a 20 mm de largura e possui uma concha de espiral alta e apresenta uma ornamentação formada por numerosas costas e estrias espirais que se cruzam originando um padrão reticulado. A abertura da concha é pequena, oval, com um canal sifonal pequeno e oblíquo e, nos animais adultos, possui externamente uma calosidade de cor branca e labro com uma crista com 6 a 9 dentes (Graham, 1988; Finet & Wüest, 1992). A cabeça possui dois tentáculos cada um dos quais com um olho. Habitam preferencialmente sedimentos vasosos mas podem ocorrer em substratos rochosos e arenosos (Graham, 1988; Finet & Wüest, 1992). São animais necrófagos e detritívoros e a sua longevidade pode atingir os 15 anos (Tallmark, 1980; Fretter & Graham, 1994; Barroso & Moreira, 1998). É uma espécie dióica com desenvolvimento indirecto; as suas larvas são planctónicas e nadam livremente durante aproximadamente um a dois meses até à ocorrência da metamorfose (Fretter & Graham, 1994). O ciclo reprodutivo de *N. reticulatus* exibe um padrão sazonal bem definido com o início da gametogénese em finais do Verão, a libertação do gametas em Fevereiro, associada a um aumento da temperatura da água; a postura ocorre na

Primavera e Verão (Tallmark, 1980; Barroso & Moreira, 1998). Uma extensa revisão bibliográfica sobre aspectos da ecologia e biologia deste gastrópode pode ser encontrada em Fretter & Graham (1994).

2 - Âmbito do trabalho

Localizado a oeste da baía de Cascais, entre o Cabo Raso e o Farol da Ponta de Santa Marta, o emissário submarino da Guia canaliza as águas residuais produzidas na região abrangida pelo Sistema de Saneamento da Costa do Estoril. Este inclui a maior parte do concelho de Oeiras (150 000 habitantes), a totalidade do concelho de Cascais (150 000 habitantes), uma área importante do concelho de Sintra (cerca de 300 000 habitantes) e uma pequena parte do concelho da Amadora (200 000 habitantes), traduzindo-se numa população equivalente (e.p.) para os quatro municípios de cerca de 720 000 habitantes. O efluente eliminado pelo emissário submarino da Guia é, actualmente, apenas sujeito a tratamento primário. O emissário apresenta uma extensão submarina de cerca de 2 750 metros sendo a parte terminal constituída por dois ramos com a extensão de 1 750 metros que distam entre si, na parte terminal, em 250 metros. A difusão do efluente ocorre nos 400 metros terminais através de vários orifícios e a uma profundidade de cerca de 40 metros (Marecos *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2002).

Em 1997, a SANEST, empresa responsável pela gestão do emissário, deu início a projectos de monitorização ambiental e, em Outubro de 2004, durante a campanha de recolha de amostras de sedimentos para a monitorização da qualidade sedimentar junto ao emissário, foram recolhidos alguns exemplares de *Nassarius reticulatus* para avaliação dos níveis de imposex. Observou-se, então, uma menor incidência de imposex nas fêmeas recolhidas em locais mais próximos ao emissário pelo que se levantou a hipótese do efluente eliminado causar uma diminuição do imposex naquele local. Decidiu-se, assim, aprofundar o estudo e avaliar novamente os níveis de imposex em *N. reticulatus* ao longo do gradiente de enriquecimento orgânico induzido pelo funcionamento do emissário.

Integrando a campanha de amostragem realizada em Julho de 2005, no âmbito do estudo e monitorização ambiental da componente sedimentar associada ao funcionamento do referido emissário, foram recolhidas amostras superficiais de sedimentos (para caracterização do gradiente de enriquecimento orgânico através do estudo de parâmetros físico-químicos do sedimento e da estrutura das comunidades bentónicas residentes) e *Nassarius reticulatus* em três locais (L1; L2; L3) com distâncias conhecidas e crescentes ao emissário. L1 localiza-se entre os 2 ramos do emissário, perto da área de difusão do efluente para o meio, enquanto que o local L2 e L3 distam de L1 em 1 e 2 Km,

respectivamente.

A constatação da existência de um gradiente crescente dos níveis de imposex em fêmeas de *N. reticulatus* com o afastamento ao local de dispersão do efluente, o qual constitui uma potencial fonte de compostos estrogénicos e/ou com actividade estrogénica, conduziu, ainda no âmbito deste trabalho, ao estudo da potencial acção antagónica entre uma fonte indutora de imposex (TBT) e uma mistura de compostos com actividade estrogénica vulgarmente presentes em efluentes domésticos. Para tal, foram realizados ensaios laboratoriais em ambiente controlado nos quais se pretendeu avaliar se uma mistura de compostos estrogenicamente activos (17 β -estradiol, estrona, 17 α -etinilestradiol e nonilfenol) pode atenuar o efeito do TBT na indução de imposex em fêmeas de *N. reticulatus*.

3- Materiais e Métodos

3.1 - Amostragem

A amostragem decorreu no dia 19/07/2005 a bordo do Navio do Instituto Hidrográfico – N.R.P. “Auriga” (figura 2), em três locais, designados neste trabalho por L1, L2 e L3.



Figura 2 – Navio do Instituto Hidrográfico “N. R. P. Auriga”, a bordo do qual decorreu a amostragem de sedimentos e organismos.

Na figura 3 estão representados os locais de amostragem L1, L2 e L3 (situados a cerca de 40 metros de profundidade) e o posicionamento destes relativamente aos ramos do emissário submarino e à linha da costa.

O local L1 localiza-se entre os 2 ramos do emissário, perto dos locais de difusão do efluente para o meio aquático; o local L2 apresenta uma localização intermédia sendo L3 o local de amostragem mais afastado. A distância entre os locais de amostragem L1 e L2 e entre os locais de amostragem L2 e L3 é de cerca de 1 Km.

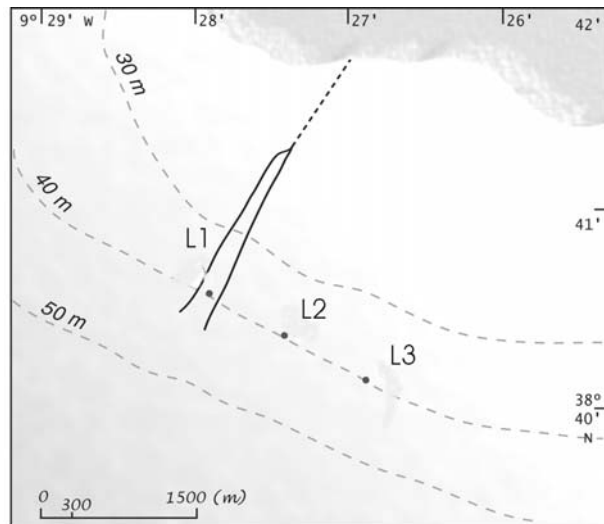


Figura 3 – Posicionamento dos locais de amostragem L1, L2 e L3, relativamente aos dois ramos do emissário submarino.

Todas as amostras de sedimento foram recolhidas recorrendo a um amostrador Smith-McIntyre, o qual apresenta uma área de amostragem de $0,1 \text{ m}^2$ (figura 4). Para o estudo da macrofauna bentónica foram recolhidas 4 réplicas por cada local. Em cada local foram ainda realizadas mais três colheitas destinada à obtenção de uma amostra compósita (resultante da mistura e homogeneização dos sedimentos obtidos nas três dragagens) a partir da qual se obtiveram sub-amostras para o estudo dos parâmetros teor em sólidos voláteis totais, potencial de oxidação-redução e granulometria, do sedimento.

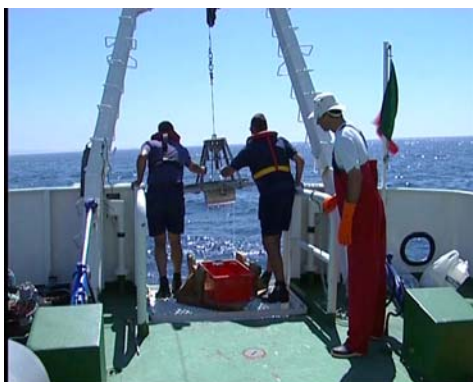


Figura 4 – Recolha de amostras de sedimento com o amostrador Smith-McIntyre.

Para o estudo da macrofauna bentónica o sedimento de cada réplica foi lavado a bordo com água do mar sobre um crivo de 1mm de abertura de malha. O material retido no crivo foi recolhido em caixas plásticas previamente identificadas, e preservado em formaldeído a 4% (figura 5). Em laboratório as amostras da macrofauna foram lavadas em crivos de 0,5mm de abertura de malha, em hotte com extracção forçada, e coradas com Rosa de Bengal.



Figura 5 – Processamento das amostras destinadas ao estudo da macrofauna bentónica.

As amostras destinadas ao estudo do teor em sólidos voláteis totais foram guardadas a bordo no frio e, no laboratório foram congeladas até ao momento da análise.

A determinação do potencial de oxidação-redução dos sedimentos foi realizada a bordo, no momento de recolha dos amostradores.

Nos mesmos locais de amostragem foram também recolhidos exemplares de *Nassarius reticulatus* com o intuito de se proceder ao estudo dos níveis de imposex nesta espécie. Para a sua recolha foram utilizadas nassas adaptadas com aros de ferro ou estruturas de chumbo de modo a impedir que aquelas fossem arrastadas com as correntes e, como engodo, foi utilizada uma mistura de sardinhas e mexilhão esmagados. Em cada local de amostragem foram lançadas várias nassas com o objectivo de obter 4 réplicas por local. Em média, as nassas estiveram submersas cerca de 1h30m antes da sua recolha. Depois de recolhidos, os animais foram mantidos a uma temperatura de cerca de 8°C (sem água) de modo a garantir a sua sobrevivência até à chegada ao laboratório.

3.2 – Caracterização Físico-Química do sedimento

No que diz respeito aos descritores sedimentares de base, os sedimentos superficiais recolhidos em cada local de amostragem foram caracterizados quanto à granulometria, ao teor em sólidos voláteis totais e potencial de oxidação-redução.

Granulometria

Para a análise granulométrica dos sedimentos foi utilizada uma sub-amostra de cerca de 200-300gr (peso húmido), obtida a partir de uma amostra compósita resultante da mistura e homogeneização das três amostras obtidas especificamente para o estudo dos descritores sedimentares.

O sedimento foi caracterizado segundo a sua percentagem de conteúdo em finos (dimensão inferior a 0,063mm) e areia (dimensão compreendido entre 0,063 e 2,000mm) (Quintino *et al.*, 1989). A fracção de areia foi sujeita a uma bateria de crivos com abertura de malha entre -1ϕ e 4ϕ ($\phi = -\log_2$ do diâmetro da partícula expresso em mm). O sedimento foi classificado de acordo com o valor da mediana (P_{50}) (Trask, 1930), segundo a escala de Wentworth (Doeglas, 1968).

Sólidos Voláteis Totais

Para a determinação do teor em sólidos voláteis totais procedeu-se, inicialmente, ao descongelamento das amostras a temperatura ambiente para posteriormente serem submetidas a processo de secagem em estufa a 90°C, durante 24h. Após secagem as amostras foram homogeneizadas.

Este descritor foi determinado a partir da variação de peso após incineração em mufla, de uma sub-amostra de 1 gr de sedimento seco e homogeneizado, a 450°C durante 5h. Antes de se proceder à pesagem, as amostras incineradas foram deixadas arrefecer durante 30 minutos num excicador (Kristensen & Andersen, 1987).

Para evitar a introdução de erros associados à variação de peso dos cadinhos de incineração, procedeu-se à determinação do peso de cada um deles à temperatura analítica (450°C).

Potencial de oxidação-redução

A determinação do potencial de oxidação-redução dos sedimentos foi realizada a

bordo, no momento de recolha dos amostradores, por inserção da sonda de um aparelho portátil de medição de pH/Eh, a cerca de 4 cm abaixo da superfície do sedimento (Pearson & Stanley, 1979).

3.3 - Comunidades de macrofauna bentónica

No laboratório, cada amostra foi lavada em água corrente sobre um crivo de 0,5 mm de abertura de malha, em hotte com extracção forçada, com o objectivo de remover a solução de fixador e os sedimentos finos ainda existentes.

O material retido foi então submetido a uma triagem na qual os indivíduos recolhidos foram separados segundo se tratassem de anelídeos, equinodermes, crustáceos, bivalves ou gastrópodes, e conservados em álcool a 70% em tubos plásticos previamente identificados. Posteriormente, procedeu-se à identificação de cada indivíduo recolhido, à contagem dos indivíduos por espécie e sua pesagem.

A identificação dos animais foi efectuada, sempre que possível, até à espécie, recorrendo a lupas binoculares e/ou microscópio óptico. Para a identificação recorreu-se à bibliografia apresentada no anexo 2.

Os animais incompletos por ausência da parte anterior não foram contabilizados como um indivíduo, mas foram incluídos para a determinação da biomassa de cada espécie (sempre que a identificação era possível) ou para a determinação da biomassa total de cada local de amostragem.

A biomassa foi determinada, para cada espécie identificada, a partir do seu peso fresco em balança analítica ($\pm 0,0001$ g).

Variáveis biológicas primárias e diversidade específica

A caracterização das comunidades de macrofauna bentónica baseou-se num conjunto de descritores de composição e de estrutura.

Para cada local de amostragem foi determinada a riqueza em espécies (correspondente à quantidade total de taxa identificadas em cada local de amostragem), abundância total em indivíduos e a biomassa total.

Os dados biológicos relativos a cada local de amostragem foram analisados através do cálculo da riqueza específica ($S - n.^{\circ}$ de espécies/ $0,1m^2$), abundância ($A - n.^{\circ}$ de indivíduos/ $0,1m^2$), biomassa ($B -$ gramas de peso fresco/ $0,1m^2$), assim como pelo cálculo

das variáveis biológicas derivadas: diversidade específica relativamente à abundância (H'), abundância média por espécie (A/S) e biomassa média por indivíduo (B/A) (Pearson *et al.*, 1982). Os valores encontram-se expressos em função da área de amostragem por local, ou seja, $0,1\text{m}^2$. Foi ainda determinado, para cada local de amostragem, a riqueza em espécies, a abundância e a biomassa da amostra compósita.

A estrutura do povoamento bentónico de cada local de amostragem foi analisada por meio da representação gráfica de curvas de dominância da abundância (curvas k, Lamshead *et al.*, 1983) e de curvas comparativas de dominância da abundância e da biomassa (curvas ABC, Warwick, 1986).

Índice de diversidade de Shannon – Wiener (H')

O recurso a índices de diversidade é bastante frequente no estudo de uma determinada comunidade permitindo uma análise estatística mais simplificada (Clarke & Warwick, 1994). Estes índices baseiam-se no conceito de diversidade de um sistema e fornecem uma medida sobre as espécies que compõem uma amostra ou ecossistema, determinada em função da riqueza em espécies e da distribuição relativa da abundância dos indivíduos pelas diferentes espécies (Legendre & Legendre, 1984).

Neste estudo, a diversidade específica de cada local de amostragem foi calculada pelo índice de Shannon-Wiener (Shannon & Weaver, 1963):

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i \quad \text{e} \quad p_i = q_i / Q ,$$

em que S é o número total de espécies, q_i é o número de indivíduos da espécie i e Q o número total de indivíduos. Este índice apresenta o valor mínimo de zero quando apenas é amostrada uma espécie ($p=1$; $q=Q$ e $\ln p_i = 0$). Para um determinado número de espécies, H' atinge o valor máximo quando todas as espécies apresentam a mesma probabilidade de serem amostradas, sendo dado por $H'_{\max} = \ln S$ (Legendre & Legendre, 1984).

Curvas de dominância

A representação gráfica permite extrair informação a partir de modelos de

abundância relativa de espécies sem reduzir a informação a um resumo de dados estatísticos como acontece com o índice diversidade. Este grupo de técnicas podem ser consideradas como intermediárias entre uma simples análise univariável e as complexas análises multivariáveis (Warwick & Clarke, 1994).

As curvas de dominância baseiam-se na ordenação das espécies presentes na amostra, segundo a sua ordem de importância em termos de abundância ou da sua biomassa e consiste, basicamente, na obtenção de uma curva cumulativa de frequência das abundâncias ou das biomassas das diferentes espécies (Clarke & Warwick, 1994).

As curvas de dominância da abundância (curvas k), segundo Lambshead *et al.* (1983), surgiram como uma técnica para análise da dominância de indivíduos por espécie com o objectivo de específico de avaliar alterações na estrutura das comunidades de invertebrados bentónicos face a enriquecimento orgânico de origem antropogénica. Este método consiste na obtenção da curva cumulativa das frequências das abundâncias das espécies representadas ao longo do eixo das abcissas, em escala logarítmica, pela ordem decrescente de abundância relativa.

A forma e a posição da curva são importantes na avaliação da estrutura do povoamento e as modificações temporais e espaciais na forma da curva indicam modificações na comunidade; um aumento na abundância das espécies dominantes (nomeadamente as oportunistas), uma modificação nas abundâncias das espécies de transição e uma redução nas espécies raras, provocam uma elevação na curva, indicando um maior grau de perturbação da comunidade (Clarke & Warwick, 1994).

As curvas de dominância da abundância e da biomassa – Curvas ABC – como descritas originalmente por Warwick (1986), constituem um método analítico para o estudo da estrutura de povoamentos, o qual explora as diferenças na distribuição dos indivíduos e da biomassa pelas espécies em comunidades sujeitas a factores de perturbação de origem antropogénica, nomeadamente, poluição orgânica. Este método baseia-se na representação gráfica simultânea de uma curva de dominância da abundância (traçada pelo método das curvas k de dominância da abundância) e de uma curva de dominância da biomassa. A vantagem destas curvas de distribuição em relação às curvas k de dominância da abundância reside no facto de que a distribuição da abundância entre espécies e a distribuição de biomassa pode ser comparada nos mesmos termos (Clarke & Warwick, 1994).

A sua utilização permite descrever três situações, de acordo com a posição relativa das curvas da abundância e da biomassa: (1) a curva da biomassa situa-se acima da curva da abundância, indicando uma maior dominância da biomassa e uma menor uniformidade da sua repartição pelas espécies. Sob condições estáveis e/ou distúrbios pouco frequentes, as espécies macrobentónicas dominantes por competição são espécies conservativas, de elevado tamanho corporal e ciclos de vida longos. Estas espécies raramente são numericamente dominantes, mas dominam em termos de biomassa; (2) as duas curvas estão muito próximas ou cruzam-se, situação intermédia em que as espécies raras de grande dimensão desaparecem e a distância entre as curvas se reduz. Quando a perturbação altera uma determinada comunidade, as espécies conservativas ficam desfavorecidas e as espécies oportunistas tornam-se muitas vezes dominantes não só numericamente mas também em termos de biomassa; (3) a curva da biomassa situa-se abaixo da curva da abundância indicando uma situação de perturbação com forte dominância numérica e valores baixos de biomassa para cada espécie (Clarke & Warwick, 1994).

A estatística W condensa, numericamente, a informação contida nas curvas ABC reflectindo o grau de sobreposição e o posicionamento relativo das curvas da abundância e da biomassa e é calculada a partir da expressão proposta por Clarke (1990):

$$W = \frac{\sum_{i=1}^s (B_i - A_i)}{[50(S-1)]}$$

em que A_i e B_i se referem à abundância e a biomassa da espécie de ordem i , respectivamente, e S o número de espécies.

O valor desta estatística poderá variar, numericamente, entre -1 e +1. Quando W tende para +1 estamos na presença do domínio de espécies de abundância reduzida mas de elevada biomassa individual. Quando W atinge o valor -1, estamos na presença da situação inversa, ou seja, o domínio de espécies com elevada abundância mas de biomassa individual reduzida (Warwick, 1986; Clarke & Warwick 1994).

Para a construção das curvas de dominância da abundância (curvas k) e das curvas ABC, bem como para o cálculo da estatística w recorreu-se ao software PRIMER v5 (Clark & Gorley, 2001).

3.4 – Avaliação dos níveis de imposex de *Nassarius reticulatus* na área de estudo

Para cada local de amostragem foram analisados apenas animais adultos (indivíduos que apresentavam externamente uma calosidade de cor branca e internamente um labro com dentes). Os animais seleccionados foram mantidos em aquários com arejamento permanente e a temperatura constante ($18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) até serem observados. Antes de serem examinados, foram anestesiados recorrendo a uma solução de MgCl_2 a 7% em água destilada durante 40 minutos. A altura das conchas (distância entre o ápice da concha e a extremidade do canal sifonal) foi medida com uma craveira com uma precisão de 0,05mm. Após se ter procedido à abertura das conchas, os animais foram observados recorrendo a uma lupa binocular e separados segundo o seu sexo. Para cada amostra, procedeu-se à medição do comprimento do pénis dos machos e das fêmeas (FPL) e estas foram ainda examinadas para a determinação do índice de sequência do vaso deferente (VDSI). Para além destes parâmetros foi também determinada a percentagem de fêmeas afectadas por imposex (% I) e o comprimento relativo do pénis das fêmeas (RPLI). Estes índices são a seguir descritos.

Índice de sequência do vaso deferente (VDSI)²

O VDSI permite avaliar o estágio de desenvolvimento do vaso deferente das fêmeas afectadas num dado local em função de uma escala desenvolvida por Stroben *et al.* (1992a). Esta escala é constituída por seis estádios VDS (sequência do vaso deferente) e é aplicada a cada fêmea individualmente (figura 6):

Estádio 0: fêmea normal;

Estádio 1: pénis rudimentar sem ducto penial, localizado por detrás do tentáculo ocular direito (pode existir uma via b alternativa, caracterizada pela ausência de pénis mas presença de um pequeno segmento de vaso deferente localizado por detrás do tentáculo ocular direito);

Estádio 2: pénis com ducto penial;

Estádio 3: pénis com ducto penial que continua num tracto distal do vaso deferente que cresce em direcção à vulva (pode existir um via b que se caracteriza pela ausência de pénis e em que o vaso deferente se desenvolve na direcção da vulva);

² O acrónimo VDSI deriva dos termos em inglês “Vas Deferens Sequence Index”.

Estádio 4: pénis com ducto penial e um vaso deferente contínuo que se estende desde a base do pénis até à vulva;

Estádio 4+: o vaso deferente passa a vulva e atinge a glândula da cápsula (Stroben *et al.*, 1992a).

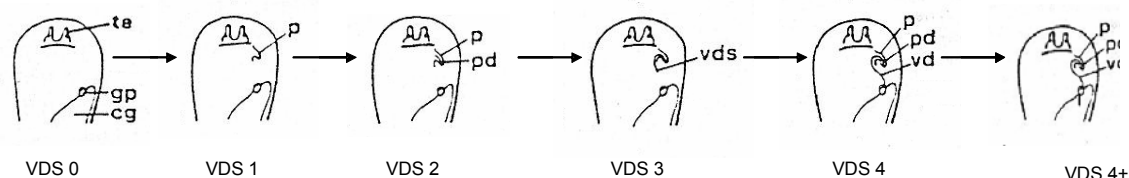


Figura 6 – Esquema da evolução do imposex (tipo a) com os diferentes estádios VDS (sequência do vaso deferente); cg: glândula da cápsula, gp: papila genital, p: pénis, pd: ducto penial, pr: próstata, vd: vaso deferente, vds: secção do vaso deferente, te: tentáculo ocular. Adaptado de Stroben *et al.* (1992a).

Face à existência de elevados níveis de imposex na costa Portuguesa, Barroso *et al.* (2002a) consideram o estágio 4+ como 5, na medida em que muitas fêmeas de locais contaminados exibem vasos deferentes que ultrapassam a glândula da cápsula. Como referido anteriormente, para além do desenvolvimento de imposex segundo o esquema descrito pela figura 6 poderá surgir uma via alternativa, designada por via b, na qual surge o vaso deferente sem que ocorra o desenvolvimento de pénis.

O VDSI é calculado como o valor médio dos estádios de VDS exibidos por cada fêmea em cada local e é considerado por Stroben *et al.* (1992a) como o índice mais adequado em estudos de biomonitorização.

Percentagem de fêmeas afectadas por imposex (% I)

Este índice reflecte a percentagem de fêmeas afectadas por imposex num determinado local, ou seja, para cada amostra este índice é calculado pela expressão:

% I= número de fêmeas afectadas por imposex*100/ número total de fêmeas observadas.

Comprimento do pénis das fêmeas (FPL)³

Um dos efeitos associados à exposição de fêmeas de *N. reticulatus* ao TBT é o aparecimento e desenvolvimento de um pénis por detrás do tentáculo ocular direito. A medição do comprimento do pénis realizou-se recorrendo a uma escala micrométrica colocada na ocular da lupa binocular com a precisão de 0,14mm.

Comprimento relativo do pénis das fêmeas (RPLI)⁴

Uma vez que a dimensão dos pénis de *N. reticulatus* pode variar geograficamente, é aconselhável estimar o grau de desenvolvimento do pénis nas fêmeas como uma medida relativa do pénis dos machos, sobretudo quando se pretende comparar o imposex de populações que se encontram geograficamente distantes umas das outras. Apesar dos locais de amostragem estarem perto uns dos outros, utilizou-se este índice para melhor mostrar o grau de desenvolvimento dos pénis das fêmeas em relação aos dos machos. Assim, este índice foi calculado, em cada local de amostragem, pela expressão:

$$\text{RPLI} = \text{comprimento médio dos pénis das fêmeas} \times 100 / \text{comprimento médio dos pénis dos machos}.$$

No entanto, este índice deve ser usado com alguma precaução uma vez que os machos exibem uma variação considerável no tamanho do pénis ao longo do seu ciclo reprodutivo (Barroso & Moreira 1998).

Análise e tratamento de dados

Testaram-se as diferenças do comprimento de pénis dos machos e das fêmeas (FPL), de VDSI, da % I e de RPLI através da análise de variâncias (ANOVA) com um factor ($\alpha = 0,05$). Relativamente aos dados de % I, a ANOVA foi realizada para os dados sujeitos a transformação arc sen (\sqrt{x})⁵. Para a realização da ANOVA verificou-se previamente que não houve violação dos pressupostos de que a distribuição dos valores dos índices de imposex dentro de cada amostra é normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) e de que existe homogeneidade das variâncias entre grupos (teste de Levene). Perante resultados

³ O acrónimo FLP deriva dos termos em inglês "Female Penis Length".

⁴ O acrónimo RPLI deriva dos termos em inglês "Relative Penis Length Index".

⁵ A transformação foi realizada pela fórmula: $y = \arcsin(\sqrt{x / 100})$.

significativos no modelo global o significado estatístico dos resultados foi posteriormente testado recorrendo ao teste de Tukey (q) com o objectivo de determinar diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) entre locais de amostragem. A análise estatística foi efectuada recorrendo ao software SigmaStat 2.0.

3.5 - Avaliação do efeito de uma mistura de compostos com actividade estrogénica e do TBT na indução de imposex em *Nassarius reticulatus*

Para avaliar o efeito que os compostos com actividade estrogénica (CAE) possam ter na atenuação da indução de imposex por TBT em *Nassarius reticulatus*, desenvolveu-se uma mistura de CAE, constituída por 17 β -estradiol, estrona, 17 α -etinilestradiol e nonilfenol, e testou-se se os animais expostos ao TBT e a esta mistura exibiam níveis de imposex inferiores aos animais expostos somente a TBT. Esta mistura de compostos com actividade estrogénica passará a ser referida pelo acrónimo MCAE ao longo do texto.

São inúmeros os estudos que evidenciam a actividade estrogénica dos compostos seleccionados para a MCAE, actuando isoladamente ou em conjunto, sobre organismos aquáticos. O desenvolvimento desta mistura teve como objectivo simular as concentrações ambientais que aqueles compostos podem apresentar em meios receptores de efluentes domésticos apenas sujeitos a tratamento primário. A utilização de apenas quatro compostos na mistura teve por base uma pesquisa bibliográfica sobre os componentes com actividade estrogénica que mais vulgarmente surgem em efluentes domésticos. A escolha das concentrações em que cada um destes compostos surge na mistura teve, também, por base essa pesquisa bibliográfica a partir da qual se determinou a concentração média a que habitualmente os referidos compostos surgem nos efluentes domésticos sujeitos a tratamento primário. Assim, foram determinados valores médios de concentração naquele tipo de tratamento de 30 ng/L para 17 β -estradiol, 3 ng/L para 17 α -etinilestradiol, 40 ng/L para estrona e 20 μ g/L para nonilfenol. No anexo 1 é apresentada uma tabela que resume os dados de alguns estudos realizados na área da identificação e quantificação de compostos estrogénicos, ou com actividade estrogénica, em influentes, efluentes de estações de tratamento de águas residuais e em meios receptores desses efluentes, os quais permitiram o cálculo das concentrações consideradas no presente trabalho.

A partir da determinação das concentrações acima referidas pretendeu-se simular a

exposição dos animais a diluições (12,5%, 25%, e 50%) de um efluente que apresentasse aqueles compostos nas concentrações referidas, de modo a nos aproximarmos das condições a que espécimes de *N. reticulatus* poderão estar sujeitos nas proximidades de um meio receptor de efluentes domésticos.

Os ensaios foram realizados com animais recolhidos em Novembro de 2006 na Ria de Aveiro. A escolha do local de colheita dos animais baseou-se nos estudos desenvolvidos em 2000 por Barroso *et al.* (2002a) e em 2003 por Sousa *et al.* (2005) os quais determinaram a incidência de imposex e a concentração de TBT nos tecidos de *N. reticulatus* em vários locais da Ria de Aveiro. Pretendeu-se utilizar fêmeas com um nível relativamente baixo de imposex para que se pudesse induzir facilmente um aumento da intensidade de imposex por exposição dos animais ao TBT durante os ensaios. Após a recolha, os animais foram transportados para o laboratório onde se procedeu à selecção dos adultos, enquanto que os juvenis foram devolvidos ao local de origem. De entre os animais adultos recolhidos foram examinadas 27 fêmeas com o objectivo de avaliar o nível de imposex daquela população no momento da colheita. Antes de serem examinadas, foram anestesiadas recorrendo a uma solução de $MgCl_2$ a 7% em água destilada durante 40 minutos. A altura das conchas foi medida com uma craveira com uma precisão de 0,05 mm. Após se ter procedido à abertura das conchas, os animais foram observados recorrendo a uma lupa binocular. Estas foram examinadas para a determinação do índice de sequência do vaso deferente (VDSI) e procedeu-se à medição do comprimento dos seus pénis (FPL) recorrendo a uma escala micrométrica colocada na ocular da lupa binocular com a precisão de 0,14mm.

Os restantes animais adultos foram mantidos no laboratório em aquários com água do mar artificial (salinidade 35), com arejamento permanente, fotoperíodo (14h luz/10h escuro) e temperatura controlados ($18 \pm 1^\circ C$). A mudança de água nos aquários ocorreu duas vezes por semana até ao início do ensaio. Os animais foram alimentados semanalmente, antes e durante o ensaio, com mexilhão congelado proveniente de locais onde os níveis de contaminação por TBT são reduzidos permitindo garantir que aquele contaminante não era introduzido, de um modo significativo, através da alimentação.

Para o ensaio pretendiam-se fêmeas adultas com um comprimento de pénis inferior a 2mm. Para se proceder à selecção daquelas, os animais foram anestesiados recorrendo a uma solução de $MgCl_2$ a 7% em água destilada durante o máximo de 15 minutos. A sua

observação foi feita recorrendo a uma lupa binocular. As fêmeas seleccionadas para este ensaio foram mantidas em aquários com água do mar artificial (salinidade 35) nas condições anteriormente descritas.

Para a avaliação dos potenciais efeitos de uma mistura de compostos com actividade estrogénica sobre o desenvolvimento de imposex em fêmeas de *N. reticulatus* foram realizados 6 tratamentos: um Controlo⁶ correspondente a água do mar artificial (salinidade 35), um Controlo de Solvente⁷ com água do mar artificial (salinidade 35) à qual se adicionou etanol na concentração máxima utilizada nos ensaios (o etanol foi utilizado como solvente quer dos compostos com actividade estrogénica quer do TBT), uma solução com água do mar artificial (salinidade 35) com TBT na concentração de 250 ng Sn-TBT/L⁸ e três soluções com água do mar artificial (salinidade 35) com TBT na concentração de 250 ng Sn-TBT/L e com concentrações crescentes da MCAE (12,5%, 25% e 50%)⁹. A escolha da concentração do TBT teve por base os trabalhos desenvolvidos por Barroso *et al.* (2002b) nos quais os animais expostos a 250 e 500 ng Sn-TBT/L, apresentaram o desenvolvimento de imposex logo após um mês de exposição.

Para estes ensaios foram utilizados frascos de vidro com 800 ml das diferentes soluções. Em cada frasco foram colocadas 5 fêmeas e por cada tratamento foram utilizadas 20 frascos.

As soluções com mistura de compostos com actividade estrogénica (250 ml) eram preparadas imediatamente antes de se proceder à mudança de água nos frascos. Para tal, foram previamente preparadas soluções stock em etanol de 17 β -estradiol (40 ng/ μ L), 17 α -etinilestradiol (4 ng/ μ L), estrona (53,3 ng/ μ L) e nonilfenol (26,67 g/L). Assim, aquela era semanalmente preparada pela introdução de 15 μ l de cada uma das soluções stock em 250 ml de água do mar artificial (salinidade 35).

⁶ Controlo correspondente a água do mar artificial (salinidade 35) será a partir deste momento apenas referida como “Controlo”

⁷ Controlo de Solvente de etanol será a partir deste momento apenas referida como “Controlo de Solvente”.

⁸ Tratamento Solução de 250 ng Sn-TBT/L será a partir deste momento apenas referida como “Tratamento TBT” ou “Solução TBT”.

⁹ Tratamento TBT (250 ng Sn-TBT/L) e mistura de compostos com actividade estrogénica 12,5% será a partir deste momento designada por “TBT + MCAE 12,5%”.

Tratamento TBT (250 ng Sn-TBT/L) e mistura de compostos com actividade estrogénica 25% será a partir deste momento designada por “TBT+ MCAE 25%”.

Tratamento TBT (250 ng Sn-TBT/L) e mistura de compostos com actividade estrogénica 50% será a partir deste momento designada por “TBT+ MCAE 50%”.

Em cada um dos frascos referentes aos tratamentos TBT e TBT + MCAE foi introduzido 10 µl de uma solução stock de TBT em etanol (0,02g Sn-TBT/L). Nos tratamentos TBT + MCAE, além da solução de TBT, foi introduzido, em cada frasco, 1,25 ml, 2,5 ml ou 5 ml da solução concentrada da mistura de compostos com actividade estrogénica, respectivamente. A correcção de volumes foi realizada para cada frasco em cada um dos tratamentos. Nos frascos controlo de solvente foi introduzido 12 µl de etanol por frasco.

O ensaio teve como data de início o dia 29 de Dezembro de 2006, após um período de aclimatização de uma semana, e decorreu no interior de uma câmara climática, modelo FITOCLIMA 10 000 EDTB, com temperatura controlada ($16 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e arejamento permanente. Apesar do fotoperíodo ser uma das variáveis com possibilidade de controlo, optou-se, neste trabalho, por manter a câmara sem iluminação, com o intuito de diminuir a fotodegradação do TBT e dos CAE. A substituição total dos meios de exposição foi realizada semanalmente, até ao final do ensaio.

No final da experiência todas as fêmeas foram examinadas com uma lupa binocular para a determinação do VDS e do comprimento de pénis.

Análise e tratamento de dados

Testou-se a significância das diferenças no comprimento médio do pénis das fêmeas nos diferentes tratamentos através da análise de variâncias (ANOVA) com um factor ($\alpha = 0,05$). Para a realização da ANOVA verificou-se que apenas se pode garantir homogeneidade das variâncias entre os grupos testados (teste de Levene) quando a variável “comprimento do pénis” é sujeita a transformação raiz quadrada. Perante resultados significativos no modelo global o significado estatístico dos resultados foi posteriormente testado recorrendo ao teste de Tukey (q) com o objectivo de determinar diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) entre os tratamentos. A análise estatística foi efectuada recorrendo ao software SigmaStat 2.0.

4 - Resultados

4.1 – Caracterização Físico-Química do sedimento

Os dados de granulometria relativos às amostras obtidas nos locais L1, L2 e L3 estão representados na tabela 1:

Tabela 1 – Composição granulométrica dos sedimentos superficiais recolhidos nos locais L1, L2 e L3, expresso em percentagem do peso seco total do sedimento.

Local	Fracções Granulométricas							Mediana (ϕ)	Classificação do Sedimento
	Areia						Finos		
	> 2mm	1-2mm	0,5-1mm	0,250- 0,5mm	0,125- 0,250mm	0,063- 0,125mm	<0,063mm		
L1	0,28	0,93	2,27	5,29	72,66	15,32	3,29	2,56	Areia fina
L2	0,08	0,49	1,96	4,16	68,08	21,62	3,64	2,64	Areia fina
L3	0,16	0,35	1,06	2,75	60,89	30,36	4,33	2,75	Areia fina

Verificou-se que a percentagem de sedimento arenoso varia entre 95,57 % no local de amostragem L3 e 96,75 % no local de amostragem L1. Os sedimentos dos três locais de amostragem são do tipo areia fina (mediana entre 2Φ e 3Φ da escala de Wentworth) com a percentagem em finos (fracção inferior a 0,063mm) inferior a 5 %.

Na tabela 2 estão representados o teor em finos e teor em sólidos voláteis totais expressos em percentagem do peso seco total da amostra, bem como o potencial de oxidação-redução (mV) determinado no momento de colheita dos sedimentos, para cada local de amostragem.

Os valores de sólidos voláteis totais registados nos três locais de amostragem são muito semelhantes sugerindo que não ocorre acumulação de finos nem de sólidos voláteis totais no local L1, apesar da sua proximidade à região de dispersão do efluente.

Pelo contrário, os valores de potencial de oxidação-redução aumentam à medida que a distância dos locais de amostragem ao emissário aumenta, tendo sido L1 o local de amostragem que apresentou o valor mais baixo deste parâmetro (-28 mV).

Tabela 2 – Teor em Finos (expresso em percentagem do peso seco total da amostra), teor em sólidos voláteis totais (expresso em percentagem do peso seco total da amostra) e potencial de oxidação-redução (mV) determinado no momento de colheita dos sedimentos, para cada local de amostragem.

Local de amostragem	Finos (%)	Sólidos Voláteis Totais (%)	Potencial de Oxidação - Redução (mV)
L1	3,29	1,14	-28
L2	3,64	1,12	+98
L3	4,33	1,26	+152

4.2 - Comunidades de macrofauna bentónica

No total dos três locais amostrados, foram identificados 122 taxa, em 114 dos quais foi possível a identificação até à espécie. Foram recolhidos um total de 4245 indivíduos em L1, 802 indivíduos em L2 e 774 indivíduos em L3. Quanto às determinações de biomassa (peso fresco) obteve-se um total de 115,353 g em L1, 33,547 g em L2 e 71,198 g em L3.

A fauna encontrada nos sedimentos dos locais de amostragem é constituída fundamentalmente por anelídeos, moluscos, equinodermes e crustáceos. Os anelídeos constituem o grupo com maior abundância (77,10%) e com maior riqueza em espécies (54,01%), no entanto, foram os moluscos que mais contribuíram para a biomassa total (81,65%).

Para além destes grupos taxonómicos referidos, espécimes de Anthozoa, Nemertes, Phoronida e Tubellaria contribuíram também para a macrofauna total.

Na tabela 3 está representada, para cada local de amostragem (amostra compósita correspondente a uma área de amostragem de 0,4m²), um resumo dos dados de riqueza em espécies, abundância total e biomassa total (expressa em gramas de peso fresco) para cada um dos grupos taxonómicos referidos.

Tabela 3 – Riqueza em espécies, abundância total e biomassa total (expressa em gramas de peso

fresco) para cada um dos grupos taxonômicos encontrados durante a campanha de amostragem na Guia em Julho de 2005 (dados referentes à amostra compósita correspondente a uma área de amostragem de 0,4m²).

Grupo taxonômico	Riqueza em espécies (n.º de espécies)			Abundância (n.º de indivíduos)			Biomassa (expressa em gramas de peso fresco)		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
Annelida									
Polychaeta	39	42	42	3505	432	550	3,6698	1,6130	2,2378
Oligochaeta	1	0	0	1	0	0	0,0002	0	0
Mollusca									
Gastropoda	2	2	3	132	21	13	56,8625	11,6213	7,5240
Bivalvia	5	11	10	147	172	61	28,3319	18,4804	56,2879
Arthropoda									
Malacostraca	20	18	11	101	66	71	0,6573	0,6927	0,9496
Echinodermata									
Asteroidea	1	0	0	2	0	0	0,0048	0	0
Echinoidea	1	1	1	229	17	2	25,4270	0,2996	2,9600
Holothurioidea	0	0	2	0	0	2	0	0	0,0627
Ophiuroidea	3	2	2	35	1	6	0,0711	0,2469	0,3228
Vários	3	3	2	93	91	41	0,1948	0,4032	0,4477
Total para cada local de amostragem	75	79	73	4245	802	774	115,353	33,547	71,1980
Total para o conjunto dos locais de amostragem	122			5821			220,0975		

Os anelídeos foram encontrados em todos os locais de amostragem, tendo sido o grupo taxonómico com maior abundância. Foram recolhidos um total de 4488 indivíduos (4487 poliquetas e 1 oligoqueta), e identificadas 64 espécies de poliquetas e 1 espécie de oligoqueta.

Dentro dos anelídeos as espécies mais abundantes, no conjunto dos locais de amostragem, pertencem à família dos Capitellidae de onde se destaca *Capitella spp.*. A maior densidade de *Capitella spp.* ocorreu no local de amostragem L1 (local mais próximo da extremidade do emissário submarino) onde foram recolhidos 2976 indivíduos no total das 4 réplicas, tendo este local apresentado 99,94 % do total dos indivíduos recolhidos deste complexo de espécies.

Também o capitelídeo *Mediomastus fragilis* apresenta uma maior densidade junto à parte terminal do emissário (108 indivíduos em L1, 5 indivíduos em L2 e apenas 1 indivíduo em L3).

No local de amostragem L1, *Capitella spp.*, contribui em cerca de 70,11% para o valor da abundância e apenas em cerca de 0,23% para o valor da biomassa. Neste local de amostragem, são os indivíduos de *Nassarius reticulatus* que mais contribuem para o valor de biomassa (48,91%). Assim, em L1 são duas espécies oportunistas a apresentar maior contribuição quer para o valor da abundância, quer para o valor da biomassa do local. Também se pode verificar que em L1, os anelídeos representam cerca de 82,59% da abundância e apenas 3,18% da biomassa total.

No local de amostragem L2 é o bivalve *Tellina fabula* que apresenta uma maior contribuição para a abundância (cerca de 19,70%). Quanto aos anelídeos, deixa de ser *Capitella spp.* a espécie com maior abundância passando a espécie *Spiophanes bombyx* a ocupar este lugar (cerca de 12,59%), seguida de *Magelona johnstoni* com cerca de 11,47% da abundância. Em termos de biomassa a espécie que domina em L2 é *T. fabula* (41,22%) seguindo-lhe o gastrópode *N. reticulatus* (34,01%). A estas duas espécies corresponde 75,23% da biomassa do local e ocupam respectivamente o 1º e o 14º lugar na ordem da abundância. Neste local de amostragem, assistimos a uma diminuição da contribuição dos anelídeos na abundância, mantendo-se, no entanto, como grupo que mais contribui para aquela variável (53,93%), e representando cerca de 4,80% da biomassa total (expressa em

gramas de peso fresco).

Em L3, são os indivíduos de *Chamelea striatula* (apesar de ocuparem 14º lugar na ordem da abundância) os responsáveis por 73,76% da biomassa do local. Verifica-se portanto, que um valor superior de biomassa em L3 se deve à presença de indivíduos com maior biomassa individual mas com um pequeno número de efectivos.

Na figura 7 está representada, para cada local de amostragem, a espécie com maior abundância e maior biomassa.

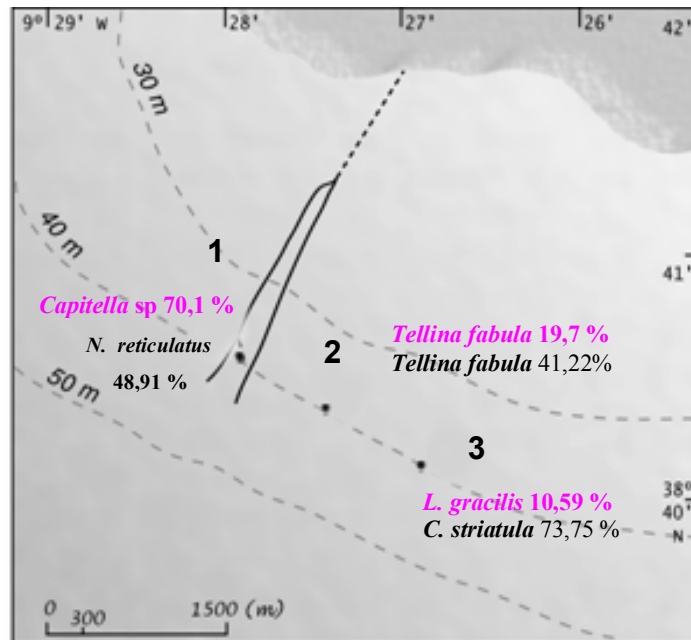


Figura 7 – Representação, em cada local de amostragem, da espécie com maior abundância (rosa) e biomassa (preto) (expresso em gramas de peso fresco).

Em L3, as abundâncias relativas das espécies mais abundantes são mais próximas entre si, de tal modo que a espécie com maior abundância relativa é o anelídeo *Lumbrineris gracilis* (10,59%) seguindo-se *Spiophanes bombyx* (9,56%), ou seja, a dominância é menor neste local. Relativamente à biomassa, é o bivalve *C. striatula* o principal responsável por

aquele valor (73,75%) seguindo-lhe o gastrópode *N. reticulatus* (10,31%).

Em L3, os anelídeos surgem como grupo que mais contribui para abundância do local, aumentando para 71,06% a sua abundância relativa, enquanto que a sua contribuição para a biomassa total decresce para 3,14%.

Pela análise dos dados aqui referidos pudemos constatar um pico de abundância e de biomassa em L1. O pico de abundância deve-se sobretudo a *Capitella spp.*, enquanto que o pico de biomassa se deve à presença de *N. reticulatus*. Estas duas espécies são consideradas espécies oportunistas e a sua presença é vulgar em locais onde existe uma carga orgânica mais ou menos acentuada (Pearson & Rosenberg, 1978; Silva *et al.*, 2004).

Na tabela 4 estão representadas, para cada local de amostragem as espécies que apresentam biomassa superior a 1% da biomassa total (valores relativos à amostra compósita por local de amostragem).

Tabela 4 – Representação das espécies que apresentam biomassa superior a 1% da biomassa total (valores relativos à amostra compósita por local de amostragem correspondente a uma área de amostragem de 0,4m²).

L1		L2		L3	
Espécie	% Biom	Espécie	% Biom	Espécie	% Biom
<i>Nassarius reticulatus</i>	48,91	<i>Tellina fabula</i>	41,22	<i>Chamelea estriatula</i>	73,76
<i>Tellina fabula</i>	24,35	<i>Nassarius reticulatus</i>	34,01	<i>Nassarius reticulatus</i>	10,31
<i>Echinocardium cordatum</i>	22,07	<i>Chamelea estriatula</i>	10,77	<i>Echinocardium cordatum</i>	4,18
<i>Diopatra marocensis</i>	1,50	<i>Phaxas pellucidus</i>	2,38	<i>Abra alba</i>	1,76
		<i>Sigalion mathildae</i>	1,85	<i>Hyalinoecia bilineata</i>	1,19
		<i>Diogenes pugilator</i>	1,37	<i>Mactra coralina</i>	1,18

Como se pode observar na tabela 4, em L1 a biomassa está distribuída, maioritariamente, por um n.º muito reduzido de espécies, estando 73,26% do seu valor associado a apenas duas espécies (*N. reticulatus*, *T. fabula*). Em L3 a espécie que representa 73,76% da biomassa, surge na 14ª posição relativamente à abundância (tabela 5). Assim, neste local de amostragem, a repartição desigual da biomassa, em favor de uma espécie, resulta da maior dimensão individual dos indivíduos e não de uma dominância

numérica.

Na tabela 5 estão representadas as espécies que apresentam abundância superior a 2% em cada local de amostragem (valores relativos à amostra compósita por local de amostragem).

Tabela 5 – Representação das espécies que apresentam abundância superior a 2% em cada local de amostragem (valores relativos à amostra compósita por local de amostragem correspondente a uma área de amostragem de 0,4m²).

L1		L2		L3	
Espécies	% Abund	Espécies	% Abund	Espécies	% Abund
<i>Capitella spp.</i>	70,11	<i>Tellina fabula</i>	19,70	<i>Lumbrineris gracilis</i>	10,59
<i>Echinocardium cordatum</i>	5,39	<i>Spiophanes bombyx</i>	12,59	<i>Spiophanes bombyx</i>	9,56
<i>Tellina fabula</i>	3,35	<i>Magelona johnstoni</i>	11,47	<i>Ampelisca sp.</i>	8,66
<i>Nassarius reticulatus</i>	3,02	Anthozoa n.i.	5,49	<i>Magelona johnstoni</i>	7,88
<i>Mediomastus fragilis</i>	2,54	Nemertea n.i.	4,99	<i>Hyalinoecia bilineata</i>	7,62
Nemertea n.i.	2,14	<i>Eumida bahusiensis</i>	4,61	<i>Magelona filiformis</i>	5,30
<i>Spiophanes bombyx</i>	1,77	<i>Chaetozone setosa</i>	3,12	<i>Chaetozone setosa</i>	4,01
		<i>Prionospio fallax</i>	2,74	<i>Clymenura clypeata</i>	3,36
		<i>Spio decoratus</i>	2,62	Nemertea n.i.	2,84
		<i>Echinocardium cordatum</i>	2,12	<i>Prionospio steenstrupi</i>	2,58
				Anthozoa n.i.	2,45
				<i>Euclymene oerstedii</i>	2,45
				<i>Tellina fabula</i>	2,45
				<i>Chamelea striatula</i>	2,33
				<i>Sthenelais limicola</i>	2,07

Pela análise da tabela 5 podemos verificar em L1 dominam numericamente, espécies oportunistas como a *Capitella spp.*, *T. fabula*, *N. reticulatus* e *Mediomastus fragilis* (Pearson & Rosenberg, 1978). O seu domínio numérico vai diminuindo à medida que nos afastamos do emissário, sendo substituídas por espécies como *Lumbrineris gracilis*, *S. bombyx* e *Hyalinoecia bilineata*, consideradas espécies típicas daquele local antes do início do funcionamento do emissário (Silva *et al.*, 2004).

Para cada um dos locais de amostragem foi determinado a abundância (A - n.º de indivíduos/0,1m²), a biomassa (B – gramas de peso fresco/0,1m²), a riqueza em espécies (n.º de espécies/0,1m²), a abundância média por espécie (A/S), a biomassa média por indivíduo (B/A) e o índice de diversidade em espécies (H') relativamente à abundância (Tabela 6). Os valores de H' variam entre 1,42 e 3,20 aumentando à medida que aumenta a distância ao emissário.

Tabela 6 – Valores de Abundância (A), Biomassa (B), Riqueza em Espécies (S), Diversidade em espécies relativamente à abundância (H'), abundância média por espécie (A/S) e biomassa média por indivíduo (B/A), para cada local de amostragem (dados referentes ao valor médio de 4 réplicas por local de amostragem, ou seja, correspondente a uma área de amostragem de 0,1m²).

Local de amostragem	A	B	S	H'	A/S	B/A
1	1061,25	28,84	42,75	1,42	25,04	0,027
2	200,50	8,37	43,25	2,83	4,59	0,041
3	193,50	17,80	44,25	3,20	4,38	0,097

Pela análise da tabela 6 verificamos que a abundância e a relação A/S diminuem com o afastamento ao emissário enquanto assistimos ao aumento da riqueza em espécies, do índice de diversidade e da biomassa média por indivíduo (B/A). A biomassa apresenta o seu valor máximo no local mais próximo ao emissário e o valor mais baixo em L2.

A distribuição da abundância pelas diferentes espécies torna-se mais uniforme com o afastamento ao emissário. Esta situação é confirmada nas curvas de dominância da abundância (figura 8).

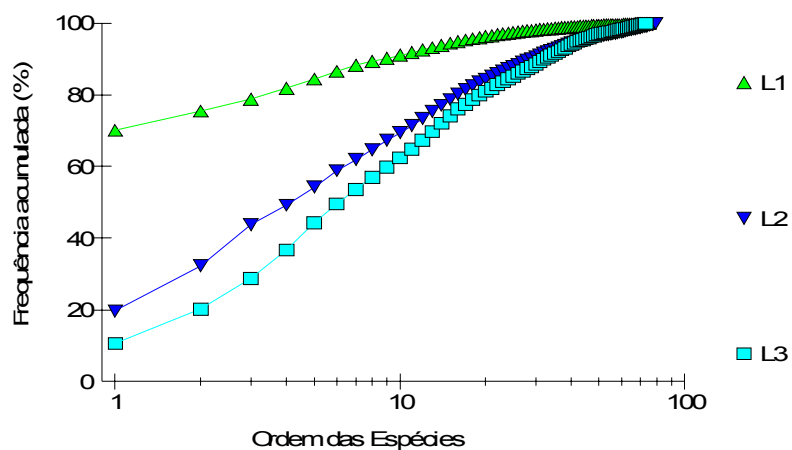
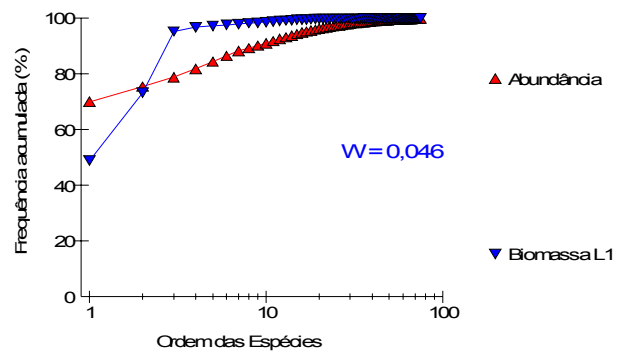


Figura 8 – Curvas de dominância da abundância para os três locais de amostragem (referentes à área de amostragem de 0,1m²).

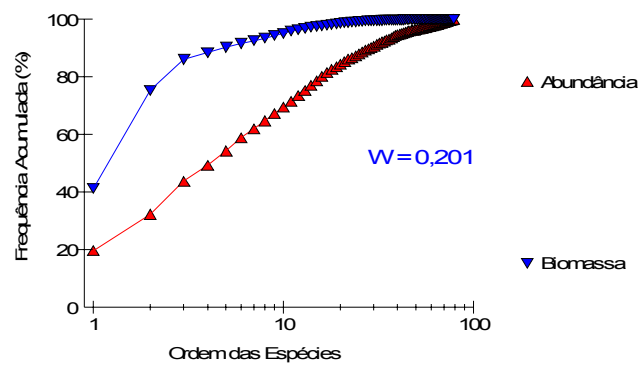
Para L1 a curva tem início acima dos 70% sendo a espécie *Capitella spp.*, como já foi referido, responsável por 70,1% da abundância. As restantes curvas indicam um grau de dominância relativamente baixo, iniciando-se a 19,7% para o local de amostragem L2 e 10,59% para L3.

Na figura 9 estão representadas as curvas de dominância da abundância e da biomassa (curvas ABC) para cada local de amostragem.

L1



L2



L3

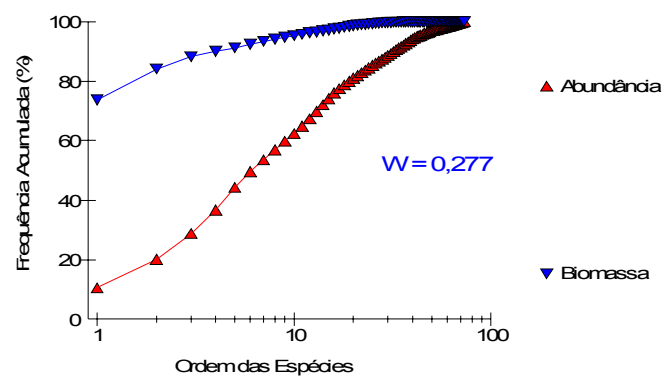


Figura 9 – Curvas comparativas da dominância da abundância e biomassa (curvas ABC) para cada local de amostragem (referentes à área de amostragem de 0,1m²).

Para o local de amostragem L1, verifica-se que a curva de dominância da abundância surge, inicialmente, num plano superior ao da biomassa. Esta situação aliada ao facto de que as curvas se mantêm muito próximas uma da outra, bem como a constatação da presença, neste local, de espécies oportunistas, sugerem que este local está sujeito a perturbação por enriquecimento orgânico, corroborando os dados relativos às espécies presentes neste local. De facto, em condições de perturbação moderada, as espécies competitivas dominantes superiores, são eliminadas e a desigualdade entre os tamanhos das espécies dominantes numericamente e em biomassa é reduzida de modo a que as respectivas curvas de dominância são quase coincidentes, podendo até cruzar-se uma ou mais vezes (Clarke & Warwick, 1994).

Para os locais L2 e L3, a curva de dominância da biomassa surge sempre num plano superior ao da curva de dominância da abundância, verificando-se, que o valor da estatística w aumenta à medida que nos afastamos do emissário ($w = 0,046$ em L1, $w = 0,201$ em L2, $w = 0,277$ em L3), indicando a presença de espécies de abundância reduzida mas de elevada biomassa individual. Em L2, *T. fabula*, *N. reticulatus* e *C. striatula*, são responsáveis por cerca de 85% da biomassa total daquele local, apenas lhes correspondendo 21,56% de abundância. Em L3, a principal responsável pelo valor de biomassa é a espécie *C. striatula* (73,76% da biomassa total com uma abundância relativa de 2,32%).

Deste modo, e salientando o facto de que os sedimentos foram recolhidos à mesma profundidade e que o teor em finos é semelhante para os sedimentos dos três locais, pela observação das curvas ABC da figura 9 poderemos constatar que à medida que nos afastamos do emissário, a perturbação introduzida pelo enriquecimento orgânico diminui, sugerindo a existência de um gradiente decrescente de enriquecimento orgânico a partir do emissário submarino.

4.3 – Avaliação dos níveis de imposex em *Nassarius reticulatus* na área de estudo

Foram recolhidos no total das nassas lançadas ao mar 4314 indivíduos em L1, 7505 indivíduos em L2 e 785 indivíduos em L3. Nas tabelas do anexo 3 são apresentados, para cada local de amostragem, os dados relativos ao nível de imposex de *Nassarius reticulatus*. Os animais foram aleatoriamente seleccionados em cada local e observados utilizando 4

amostras (réplicas) por estação de amostragem. Foram observadas, no total das 4 réplicas por local de amostragem, 146 fêmeas (40; 40; 26; 40) e 94 machos (20; 20; 34; 20) de L1, 162 fêmeas (48; 40; 40; 34) e 85 machos (19; 20; 20; 26) de L2, 145 fêmeas (35; 29; 17; 64) e 125 machos (25; 31; 13; 56) de L3. Na figura 10 estão indicados os valores de VDSI, de % I, de FPL e de RPLI determinados para cada local de amostragem. O comprimento de pênis das fêmeas encontra-se expresso em milímetros.

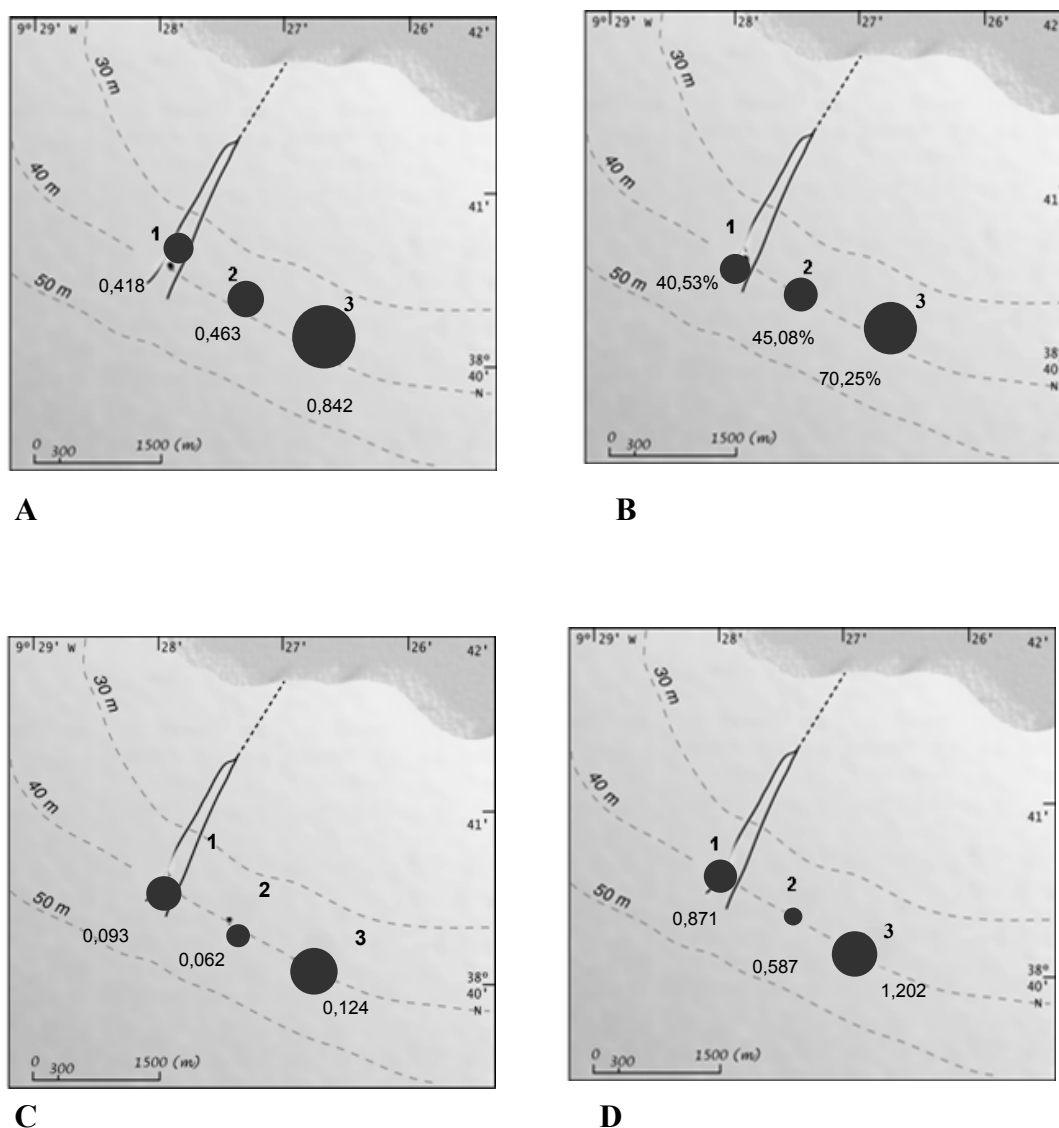


Figura 10 – Valores de VDSI (A), % I (B), FPL (C – valores expressos em mm) e RPLI (D) observados em *Nassarius reticulatus* em cada local de amostragem.

Como se pode verificar pelos dados da figura 10, o valor mais elevado de VDSI foi obtido para as fêmeas recolhidas no local de amostragem L3 (0,842), ao qual corresponde também a percentagem mais elevada de fêmeas afectadas por imposex (70,25%). O local L2 registou valores intermédios de VDSI (0,463) e de % I (45,08%) tendo sido no local de amostragem L1 que se obtiveram os valores mais baixos dos índices atrás referidos, 0,418 e 40,53%, respectivamente.

O gradiente crescente de L1 para L3 relativamente aos índices VDSI e % I não foi observado relativamente aos índices FPL e RPLI. De facto, verificou-se que no local L2 as fêmeas apresentam os valores mais baixos quer de FPL (0,062mm) quer de RPLI (0,587). Foi em L3 que se observaram os valores mais elevados de FPL (0,124mm) e RPLI (1,202). O local de amostragem L3 foi o único local onde surgiram fêmeas que apresentavam vias b (3 animais no estádio 1 b) no processo de evolução de imposex. Quanto ao comprimento do pénis dos machos (tabela 7) não se registaram variações significativas para os três locais de amostragem (ANOVA: $F= 0,351$; $P=0,714$), de onde se conclui que o comprimento de pénis dos machos não teve um efeito importante na variação do RPLI observada entre aqueles locais.

Tabela 7 – Valores médios de comprimento de pénis dos machos (PL) e respectivos desvios padrão observados em cada local de amostragem (valores expressos em mm). M PL: valores médios de comprimento de pénis dos machos; s: desvio padrão

Local	M PL	s
L1	10,584	0,596
L2	10,480	0,390
L3	10,328	0.350

Na figura 11 estão representados os valores de VDSI, de % I, de FPL, de RPLI e respectivos desvios padrão, determinados para cada local de amostragem.

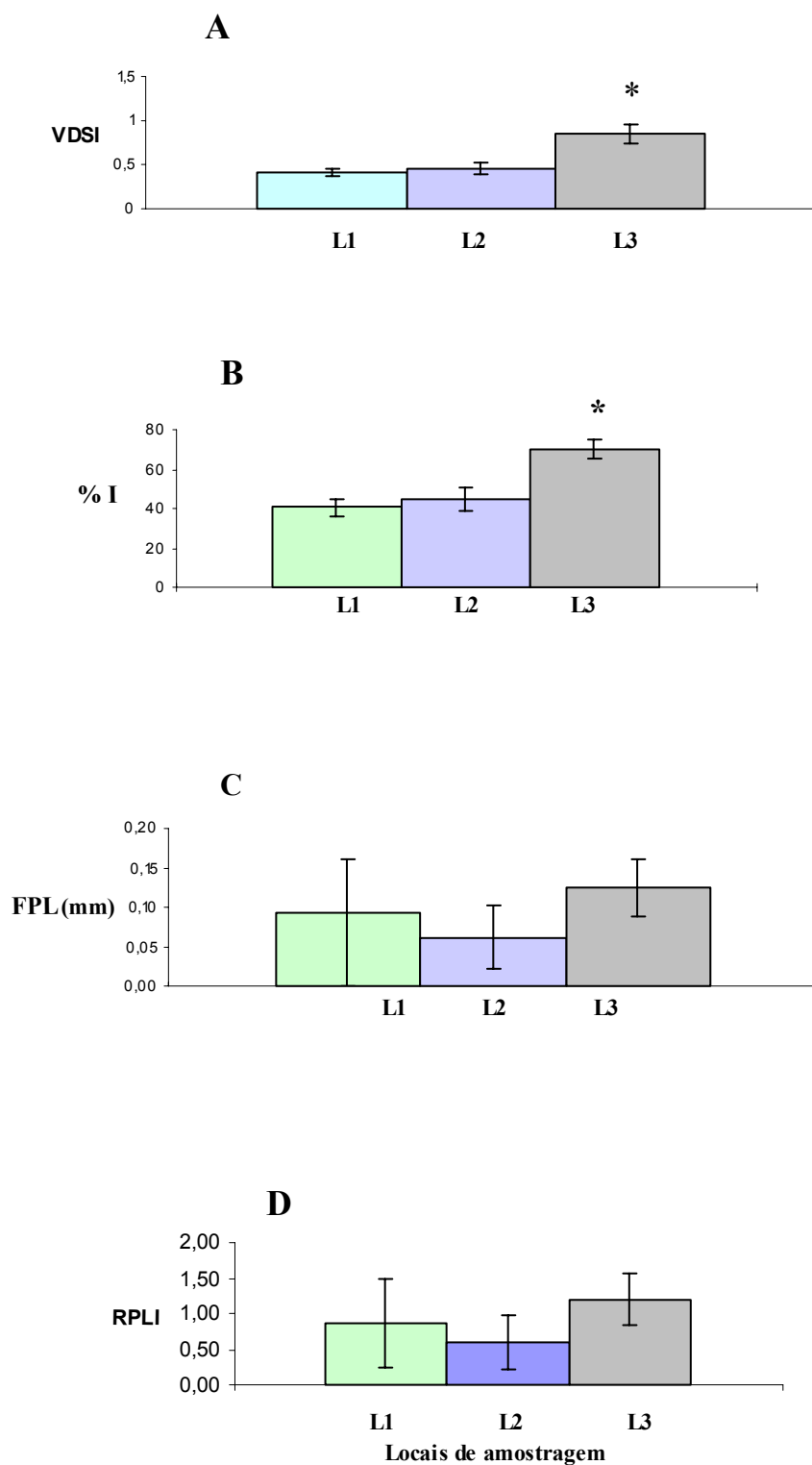


Figura 11 – Valor de VDSI (A), de % I (B), de FPL (C), de RPLI (D) em cada local de amostragem; as barras de erro dizem respeito aos respectivos desvios padrão. O símbolo * denota diferença com significado estatístico relativamente a L1 e a L2 (Teste de Tukey, $P < 0,001$).

Após determinação dos parâmetros em estudo, verificou-se que os valores de VDSI e a percentagem de fêmeas afectadas por imposex (% I) aumentam com o afastamento ao emissário submarino, tendo-se verificado a existência de diferenças significativas nos valores de VDSI (ANOVA: $F=34.9$; $P<0.001$) e de % I (ANOVA: $F=40.4$; $P<0.001$) nos três locais de amostragem. De facto, verificou-se que os animais recolhidos em L3 apresentam um valor médio de VDSI de 0,842, o qual é significativamente superior ao valor registado em L2 (VDSI= 0,463; $q=9.61$; $P<0.001$) e em L1 (VDSI=0,418; $q=10.76$; $P<0.001$). No que diz respeito aos valores de % I, verificou-se que em L3 70,25% das fêmeas exibem imposex e que esta frequência é significativamente superior à registada em L2 (% I= 45,08%; $q=10.01$; $P<0.001$) e em L1 (% I= 40,53; $q=11.79$; $P<0.050$).

Quanto aos valores de FPL e RPLI, verificou-se que estes não apresentam o mesmo gradiente de variação dos índices VDSI e % I. De facto, os índices de FPL e RPLI apresentam o valor mais baixo em L2 (0,062 e 0,587, respectivamente) e o valor mais elevado em L3 (0,124 e 1,202, respectivamente). No entanto, não existem diferenças significativas entre os valores de FPL ($F=1.55$; $P=0.26$) e de RPLI ($F=1.738$; $P=0.230$) nos três locais de amostragem.

4.4 - Avaliação do efeito de uma mistura de compostos com actividade estrogénica e do TBT na indução de imposex em *Nassarius reticulatus*

Os níveis de imposex de *Nassarius reticulatus* recolhidos na Ria de Aveiro em Novembro de 2006 estão representados na tabela 8.

Tabela 8 – Valores médios de altura de concha, VDSI e FPL, e respectivos desvios padrão (s), de fêmeas recolhidas na Ria de Aveiro para inclusão na experiência. N: número de fêmeas observadas.

N	Fêmeas					
	Altura de Concha (mm)		VDSI		FPL	
	média	s	média	s	média	s
27	25,89	2,33	3,04	0,77	1,32	1,31

Pretendia-se, inicialmente, proceder à observação das fêmeas de 10 das 20 réplicas de cada ensaio, ao fim de 45 dias de exposição, e das restantes ao fim de 90 dias. No

entanto, o cumprimento deste objectivo não se tornou possível devido a uma avaria no sistema de controlo de temperatura da câmara climática. Deste modo, procedeu-se à observação de todas as réplicas nos 2 dias subsequentes à avaria daquela. A experiência foi, por isso, interrompida a 30 de Janeiro de 2007.

Durante o período de exposição morreram 2 animais de frascos distintos do tratamento TBT+MCAE 12,5%.

Na tabela 9 estão apresentados os dados relativos a VDSI e FPL obtidos ao fim 30 dias do ensaio.

Tabela 9 – Valores médios de VDSI e de FPL obtidos ao fim de 30 dias de exposição nos diferentes tratamentos: C – Controlo; CS – Controlo de Solvente; TBT (250 ng Sn-TBT/L); TBT+ MCAE 12,5%; TBT+ MCAE 25%; TBT+ MCAE 50%. H – Altura de concha expressa em milímetros; M – valor médio; s – desvio padrão.

Trat.	H (mm)		VDSI		FLP	
	M	s	M	s	M	s
C	26,002	2,219	2,429	0,885	0,614	0,447
CS	26,092	2,231	2,442	0,965	0,709	0,559
TBT	25,849	2,573	2,798	0,615	3,509	1,583
TBT + MCAE 12,5%	26,027	2,436	2,793	0,613	3,242	1,382
TBT + MCAE 25%	26,084	2,235	2,768	0,660	3,267	1,523
TBT + MCAE 50%	26,252	2,411	2,660	0,789	2,994	1,485

Registou-se, relativamente ao Controlo, um aumento dos valores dos índices de imposex no tratamento em que o TBT foi introduzido, tendo sido o índice FPL o que mostrou o maior aumento (Tabela 9).

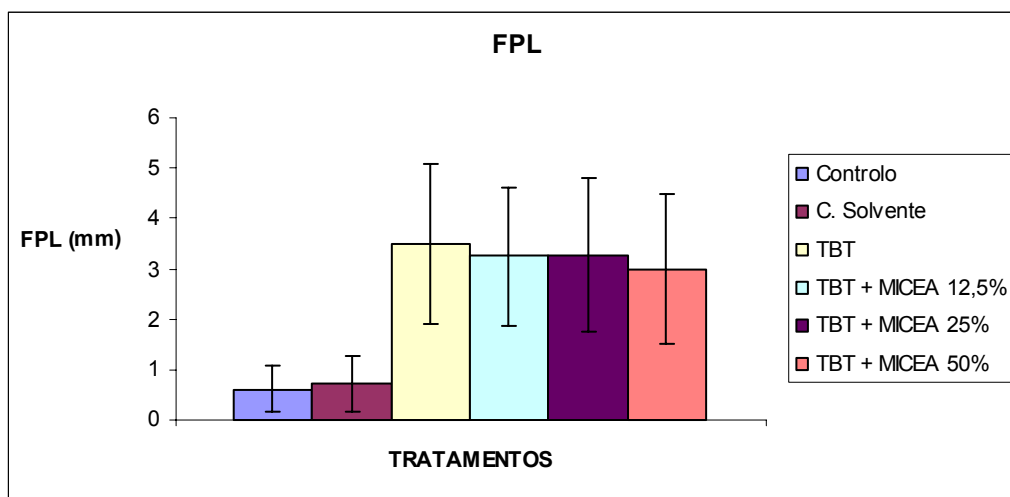


Figura 12 – Valores médios do comprimento de pénis (FPL) para os tratamentos Controlo, Controlo de Solvente, TBT (250 ng Sn-TBT/L) e soluções de TBT (250 ng Sn-TBT/L) com adição da mistura de compostos com actividade estrogénica (MCAE 12,5%, MCAE 25% e MCAE 50%); as barras de erro dizem respeito aos respectivos desvios padrão das médias determinadas.

Verificou-se que os animais em todos os tratamentos em que o TBT foi introduzido apresentaram pénis de maior comprimento relativamente aos animais dos tratamentos Controlo e Controlo de Solvente (figura 12). De facto, o FPL nos tratamentos em que foi introduzido TBT variou entre 2,99 mm e 3,51mm enquanto que nos tratamentos Controlo e Controlo de Solvente apresentou valores de 0,614 mm e 0,709 mm, respectivamente. A análise estatística mostrou existirem diferenças significativas nos valores do comprimento do pénis (sujeitos a transformação raiz quadrada) entre os tratamentos (ANOVA: $F=100,55$; $P < 0,001$). Não se observaram diferenças significativas entre os valores de FPL do Controlo e do Controlo de Solvente ($q=0,677$; $P=0,997$), podendo-se concluir que o etanol utilizado como solvente dos compostos em estudo não induziu o desenvolvimento de imposex. No entanto, os animais dos tratamentos em que foi introduzido TBT apresentaram pénis com comprimento significativamente superior aos dos animais do Controlo (Teste Tukey: $17,124 < q < 21,366$; $P < 0,001$) e do Controlo de Solvente (Teste de Tukey: $17,124 < q < 20,001$; $P < 0,001$), o que comprova que o TBT tem um efeito significativo na indução de imposex.

Quando os animais são expostos a TBT (250 ng Sn-TBT/L) em simultâneo com

concentrações crescentes da MCAE (12,5%, 25% e 50%) os valores de FPL diminuem ligeiramente quando comparados com o tratamento TBT. No entanto, uma vez que não se observaram diferenças significativas nos valores de FPL (após transformação raiz quadrada) entre o tratamento TBT e os tratamentos TBT + MCAE 12,5% ($q=1,024$; $P=0,979$), TBT+MCAE 25% ($q=1,214$; $P=0,956$) e TBT+MCAE 50% ($q=2,995$; $P=0,278$), conclui-se que a adição da mistura de compostos com actividade estrogénica não teve um efeito significativo no desenvolvimento de imposex.

5 – Discussão

A análise granulométrica realizada revelou que os três locais de amostragem apresentam sedimentos do tipo areia fina, com um teor em finos inferior a 5 % registando-se um ligeiro aumento no valor deste parâmetro com a aproximação à entrada do estuário, o qual constitui a principal fonte de introdução de finos nesta região costeira (Neves *et al.*, 2002).

Muita da importância da presença de fracções de finos deve-se ao facto de, quanto maior a proporção que elas apresentam num sedimento, menor será o espaço entre as partículas que o constituem condicionando a capacidade de drenagem e de oxigenação do sedimento e, deste modo, o tipo de habitat disponível para os organismos. Por outro lado, se a proporção de partículas com tamanho inferior a 0,063 mm for elevada, é provável que o sedimento apresente uma elevada fracção de matéria orgânica (Little, 2000). No entanto, o teor em finos e os valores de sólidos voláteis totais registados nos três locais de amostragem são muito semelhantes entre si sugerindo que, apesar da maior proximidade de L1 à região de dispersão do efluente, não ocorre neste local acumulação de finos nem de sólidos voláteis totais.

À medida que a distância dos locais de amostragem ao emissário aumenta, os valores de potencial de oxidação-redução dos sedimentos aumentam. O valor mais baixo deste parâmetro foi determinado no sedimento do local L1 (-28 mV) apesar do seu conteúdo sólidos voláteis totais ser ligeiramente superior ao registado em L2. A conjugação destes dois parâmetros, associado ao facto de que não existe variação significativa no teor em finos nos três locais de amostragem e que, a colheita dos sedimentos ocorreu à mesma profundidade e no mesmo momento de amostragem, poderá indiciar que nas imediações do emissário submarino, o meio receptor apresenta capacidade de degradar eficazmente a carga orgânica que recebe. Esta degradação ocorre, provavelmente, pela acção de comunidades bacterianas consumidoras de oxigénio, justificando deste modo o valor negativo do potencial de oxidação-redução à semelhança do que havia já sido detectado em anos anteriores (Silva *et al.*, 2004). O principal constituinte de efluentes domésticos com acção nefasta sobre o meio receptor é a matéria orgânica, uma vez que a sua oxidação bacteriológica conduz ao consumo de grandes quantidades de oxigénio. A introdução de matéria orgânica num determinado ecossistema aquático, com conseqüente diminuição de

oxigénio, pode conduzir a um desenvolvimento exacerbado de espécies oportunistas. Mesmo que os efluentes sejam tratados, a sua libertação em meio aquático pode conduzir a alterações nas comunidades dos meios receptores. Isto pode ocorrer com maior frequência se as estações de tratamento de efluentes apenas efectuarem tratamentos primários e/ou secundários, os quais removem a matéria orgânica mas deixam em solução elevadas concentrações de nutrientes como nitratos e fosfatos (Litle, 2000).

A zona de descarga do efluente apresenta excepcionais condições hidrodinâmicas para lançamento de efluentes, devido à combinação das características do fundo do mar com a hidrodinâmica das correntes, induzidas pelas marés e por ventos fortes, que provocam à superfície uma corrente residual para noroeste no sentido do mar alto e velocidades elevadas no fundo, susceptíveis de assegurar assim um poderoso mecanismo adicional de dispersão (Marecos *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2002), podendo deste modo, impedir a acumulação de sólidos voláteis totais nas proximidades do emissário (Marecos, 2001).

Relativamente aos dados biológicos, verificaram-se, nas proximidades do emissário, alterações na macrofauna bentónica que podem ser atribuídas ao contributo orgânico do efluente, nomeadamente a instalação de espécies oportunistas as quais são capazes de se reproduzir e crescer rapidamente, tirando partido imediato de alguma alteração no meio ambiente em que ocorre a eliminação de competição (Pearson and Rosenberg, 1978). O indicador mais universal de poluição orgânica num determinado local é a presença de *Capitella spp.*, (Litle, 2000). Tratam-se de anelídeos detritívoros não selectivos, com uma fecundidade elevada, maturação sexual precoce e grande variabilidade genética, o que favorece uma adaptação rápida a um meio predominantemente instável (Pianka, 1970; Grassle & Grassle, 1974). Aquele complexo de espécies ausente da macrofauna bentónica daquele local antes do início do funcionamento do emissário (Quintino *et al.*, 2006) e ausente em L3, foi o taxa predominante em L1 suplantando o anelídeo *Hyalinoecia bilineata* considerado como uma das espécies típicas daquele local antes do início do funcionamento do emissário (Silva *et al.*, 2004). Há ainda que salientar a presença de outras espécies oportunistas ou tolerantes, características de locais sujeitos a enriquecimento orgânico, como *Nassarius reticulatus*, *Abra alba*, *Corbula gibba*, *Tellina spp.*, *Tharyx spp.*, *Caulleriella spp.*, *Pseudopolydora spp.* e *Spiochaetopterus spp.* (Pearson and Rosenberg, 1978; Clarke & Warwick, 1994), apresentando um elevado número de

indivíduos em L1 e o decréscimo do seu número, à medida que nos afastamos da extremidade do emissário.

Sendo *Hyalinoecia bilineata* uma espécie abundante na plataforma costeira, ao largo de Cascais, em zonas de areia fina a muito fina (www.biorede.pt) a sua distribuição, nos locais de amostragem estudados, contrária à da *Capitella spp.*, sugere que o local L3 se aproxima das condições de pré-funcionamento do emissário. No presente estudo, verificou-se, à semelhança de outras campanhas de amostragem (Silva *et al.*, 2004) que o local mais próximo ao emissário apresentou o valor mais baixo de riqueza em espécies mas os valores mais elevados quer de biomassa quer de abundância. O aumento da riqueza em espécies e a diminuição da abundância de L1 para L3, associado ao pico de biomassa registado em L1, evidenciam neste local, a presença de uma perturbação segundo o modelo SAB proposto por Pearson & Rosenberg (1978). Este modelo explica a variação das variáveis biológicas primárias (abundância, biomassa e riqueza em espécies) na sucessão da macrofauna bentónica ao longo de um gradiente de enriquecimento orgânico. Assim, perante um gradiente decrescente de enriquecimento orgânico, no tempo ou no espaço, este modelo propõe a existência de uma zona altamente poluída, uma zona poluída e uma zona de transição relativamente a uma zona “normal” presente no final desse gradiente e à qual corresponderá uma comunidade não perturbada. A zona altamente poluída não apresenta macrofauna; a zona poluída apresenta uma riqueza em espécies inferior à observada na zona não perturbada mas uma elevada abundância devido à presença de espécies oportunistas e à qual corresponde um pico no valor da biomassa. Finalmente, a zona de transição apresenta os valores mais elevados de biomassa e de riqueza em espécies, enquanto que a abundância continua a apresentar um valor superior ao da zona de referência mas inferior ao da zona poluída.

Relativamente ao aumento da biomassa observado de L2 para L3, verifica-se que este aumento se deve à presença de espécies características das condições de referência que, apesar de um baixo número de efectivos, apresentam uma elevada biomassa individual como é o caso da espécie *Chamalea striatula* (Silva *et al.*, 2004). Assim, a variação de biomassa observada, resulta da maior dimensão individual dos indivíduos e não de uma dominância numérica.

Pearson *et al.* (1982) propuseram a análise da presença de gradientes de enriquecimento orgânico mediante a avaliação das variações das relações A/S e B/A.

Assim, sucessivos aumentos da relação B/A e a diminuição da relação A/S indiciam o afastamento à fonte de perturbação. No presente trabalho verificámos que se assiste a esta situação, ou seja, que a biomassa média por indivíduo aumenta com o afastamento ao emissário enquanto que a abundância média por espécie diminui. Também o aumento do valor do índice de diversidade H' de L1 para L3 sugere o afastamento a uma fonte de perturbação.

A variação observada para os valores de abundância, riqueza em espécies, índice de diversidade e a relação A/S, bem como a diminuição ou ausência de indivíduos de espécies oportunistas, corroboram o afastamento a uma fonte de enriquecimento orgânico.

A análise da estrutura do povoamento através da construção de curvas de dominância (curvas k) e de curvas ABC, sugerem para o local L1, uma zona de perturbação uma vez que a curva de dominância da abundância surge, inicialmente, num plano superior ao da biomassa. Esta situação aliada ao baixo valor da estatística w (0,046), bem como a constatação da presença, neste local, de espécies oportunistas, sugerem que este local está sujeito a perturbação por enriquecimento orgânico. De facto, em condições de perturbação moderada, as espécies competitivas dominantes superiores são eliminadas e a desigualdade entre os tamanhos das espécies dominantes numericamente e em biomassa é reduzida de modo a que as respectivas curvas de dominância são quase coincidentes, podendo até cruzar-se uma ou mais vezes (Clarke & Warwick, 1994).

Em L3, a biomassa é dominada por um número limitado de espécies de maior tamanho, cada uma das quais representada por um pequeno número de indivíduos, enquanto que a dominância numérica surge para espécies mais pequenas, o que é característico de comunidades não sujeitas a perturbação. Nesta situação a distribuição do número de indivíduos pelas espécies é mais uniforme do que a distribuição da biomassa, a qual apresenta uma dominância mais intensa pelo que a curva de dominância da biomassa, surge superiormente à curva da abundância ao longo de toda a sua extensão (Clarke & Warwick, 1994).

A informação recolhida por este estudo revelou existência de alguns efeitos ambientais, provavelmente associados à eliminação de águas residuais pelo emissário submarino da Guia. As alterações, ou substituição de espécies, observadas na composição das comunidades bentónicas bem como as curvas ABC sugerem a existência de um gradiente de enriquecimento orgânico que diminui com o aumento da distância à

extremidade do emissário. Assim, o local de amostragem L1 exibe condições típicas de locais moderadamente poluídos por enriquecimento orgânico. Neste local observaram-se alterações da fauna macrobentónica que podem ser atribuídas ao enriquecimento orgânico induzido pelas descargas de efluentes, nomeadamente a instalação e/ou predominância de espécies oportunistas como por exemplo *Capitella spp.* e *N. reticulatus*. Estes impactos no meio receptor, introduzidos pelo emissário submarino da Guia, mínimos e altamente localizados não são de todo inesperados devido às características hidrodinâmicas que aquele local apresenta.

Podemos, em síntese, afirmar que o emissário submarino da Guia introduziu no meio receptor, embora de uma forma moderada e localizada, alterações em alguns descritores do meio sedimentar.

Durante a campanha de amostragem foram recolhidos *N. reticulatus*, através de diversas nassas lançadas ao mar em cada local, com o intuito de se proceder à avaliação dos níveis de imposex nas imediações do emissário submarino. Foram encontradas fêmeas afectadas por imposex em todos os locais de amostragem, tendo sido registados valores de VDSI e de % I que variaram entre 0,418 e 0,842 e, entre 40 a 70%, respectivamente. A presença de *N. reticulatus* com imposex em mar alto não deverá constituir surpresa. De facto, foi descrita por ten Hallers-Tjabbes e seus colaboradores (1994), pela primeira vez, a ocorrência de imposex em populações do gastrópode *Buccinum undatum* no Mar do Norte em locais afastados da costa. Posteriormente foram descritas descobertas similares relativamente aos gastrópodes *Bolinus brandaris*, *Hexaplex trunculus* and *Thais haemastoma* no Mar Mediterrânico (Gómez-Ariza *et al.*, 1999; Morabito *et al.*, 1999), *Cassidaria tyrrhena*, *Colus gracilis*, *Cymbium olla* and *Bolinus brandaris* no Atlântico ao longo da costa Ibérica (Boon, 2001) e em *Neptunea antiqua* no Mar do Norte (ten Hallers-Tjabbes *et al.*, 2003). Também o estudo realizado por Rato *et al.* (2006) revelou que as populações de *N. reticulatus* ao longo de uma vasta área do noroeste da plataforma continental Portuguesa, até 35 m de profundidade, se encontram contaminadas por TBT e exibem imposex.

A análise de imposex ao longo do gradiente de enriquecimento orgânico induzido pelo funcionamento do emissário submarino da Guia, mostrou que os valores de VDSI e a percentagem de fêmeas afectadas por imposex (% I) aumentam à medida que nos afastamos do emissário submarino. Estes resultados vieram confirmar a observação

realizada numa campanha anterior (Outubro de 2004) de que os níveis de imposex naqueles gastrópodes era menor em locais mais próximos do emissário. No entanto, os valores de FPL e RPLI não exibiram o perfil de variação dos índices VDSI e % I, o que à partida parece sugerir alguma contradição. Stroben *et al.* (1992a) verificaram a existência de correlação estatisticamente significativa entre o tamanho de pénis e o estágio de VDS. No entanto, estes mesmos autores observaram que o comprimento do pénis aumenta, geralmente, do estágio 1 ao 4, e é a partir do estágio 3 que podem surgir variações de tamanho mais significativas (0,1 a 10,8 mm no estágio 3; 1,0 a 18,0 mm no estágio 4 e 2,0 a 14, 0 mm no estágio 4+). Neste estudo obtiveram-se, para qualquer um dos locais de amostragem, valores médios de VDSI inferiores a 1 e, deste modo, segundo o que atrás ficou dito, será de esperar que a amplitude de variação do comprimento de pénis não seja muito elevada. Alguns autores (Oehlman *et al.*, 1998) indicam a utilização do VDSI como o parâmetro biológico mais aconselhado em estudos de monitorização, uma vez que este índice se caracteriza por apresentar menos desvios aos dados obtidos a partir de equações concentração/efeito e, porque poderão existir fêmeas afálicas com imposex (vias b) sendo nestes casos o imposex subestimado se forem utilizados índices que se baseiam no tamanho de pénis (FPL e RPLI). Assim, entre os parâmetros vulgarmente utilizados na avaliação dos níveis de imposex, o VDSI e a percentagem de fêmeas afectadas apresentam maior aplicação em programas de monitorização (Barroso, 2001).

A existência de um gradiente de imposex decrescente com a aproximação ao emissário poderá dever-se, hipoteticamente, a uma diminuição da concentração de TBT nos tecidos dos animais e/ou à influência de compostos com actividade estrogénica presentes nas águas residuais rejeitadas pelo emissário submarino. Para testar estas hipóteses é fundamental, no futuro, quantificar aqueles compostos nos tecidos de *N. reticulatus*, nos sedimentos e na coluna de água nos diferentes locais de amostragem.

Apesar de no presente estudo não terem sido realizadas análises químicas às águas residuais eliminadas pelo emissário, sabe-se que aquele tipo de efluentes são uma complexa mistura de poluentes que poderão apresentar propriedades ou capacidade de provocar disrupção endócrina (Solé *et al.*, 2003). Entre estes compostos encontramos os produtos de degradação de alquifenóis, hidrocarbonetos aromáticos, ftalatos, dioxinas, furanos, herbicidas, pesticidas, fármacos e hormonas esteróides. Apesar de poderem existir compostos com potencial actividade androgénica (Kirk *et al.*, 2002; Leusch *et al.*, 2006),

nomeadamente TBT (Voulvoulis & Lester, 2006), o efeito global dos efluentes de origem doméstica é predominantemente estrogénico na maioria dos casos. De facto, são muitos os estudos que referem a presença de compostos disruptores endócrinos com actividade estrogénica nos efluentes domésticos e que descrevem a influência/efeitos destes em organismos aquáticos (Desbrow *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2003; Solé *et al.*, 2003; Nakari, 2004; Quinn *et al.*, 2004). A comunidade científica tem manifestado grande atenção relativamente aos compostos capazes de interagir com o receptor humano de estrogénio α (hER α). Estes compostos apresentam uma grande variedade estrutural devido à natureza flexível do domínio de ligação daquele receptor (Brzozowski *et al.*, 1997) e podem afectar as funções endócrinas de muitas espécies uma vez que os receptores estrogénicos são estruturalmente similares entre os organismos de diferentes grupos taxonómicos. Em invertebrados, nomeadamente em gastrópodes, já foram identificadas hormonas esteróides (testosterona e 17 β -estradiol) e receptores de estrogénios similares aos de vertebrados (Jobling *et al.*, 1998; Routledge *et al.*, 1998; DeFur *et al.*, 1999; Tilton *et al.*, 2002; Thornton *et al.*, 2003; Kajiwarra *et al.*, 2006).

Para testar a hipótese de que o gradiente de imposex se deve à influência de compostos com actividade estrogénica presentes nas águas residuais rejeitadas pelo emissário submarino realizaram-se, neste trabalho, experiências laboratoriais em que se procedeu à exposição de fêmeas de *N. reticulatus* a uma mistura de 17 β -estradiol, estrona, 17 α -etinilestradiol e nonilfenol. São inúmeros os estudos que evidenciam a actividade estrogénica de qualquer um dos compostos inseridos na mistura, actuando isoladamente ou em mistura, sobre organismos aquáticos (Desbrow *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2004). Os métodos mais vulgares de avaliação de risco ecológico baseiam-se na avaliação de moléculas isoladas. Isto constitui, no entanto, um contraste com o que se verifica no meio ambiente, no qual os organismos se encontram em contacto com uma grande variedade de compostos estrogénicos. Estes compostos, isoladamente e nas concentrações em que vulgarmente se encontram nos meios aquáticos raramente causaram efeitos estrogénicos, excepção feita para o 17 α – etinilestradiol e para o 17 β – estradiol. Contudo, quando em acção conjunta, esses compostos podem desencadear efeitos, os quais serão subestimados se apenas se estudarem os compostos isoladamente (Fent *et al.*, 2006). Sabe-se actualmente, que compostos com actividade estrogénica actuam de forma aditiva quando inseridos em misturas complexas (Payne *et al.*, 2000). Sumpter e Joblin (1995)

observaram, após exposição *in vitro* de hepatócitos de peixes a uma mistura de compostos com actividade estrogénica, efeitos sugestivos de uma acção sinergista na produção de vitelogenina. Estudos recentes (Rajapakse *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002; Brian *et al.*, 2005) demonstraram que misturas de disruptores endócrinos com o mesmo mecanismo (estrogénico) de acção, cada um dos quais presente em concentrações inócuas quando isolados, foram capazes de produzir efeitos para os quais cada substância contribuiu na proporção da sua potência. Torna-se, por isso, necessário avaliar a actividade de misturas desses compostos e se as concentrações em que eles se encontram no meio ambiente são suficientes para causar efeitos fisiológicos adversos nos indivíduos ou populações expostas (Kolpin *et al.*, 2002).

A escolha dos quatro compostos na mistura, bem como as concentrações em que foram utilizados, teve por base o conhecimento que existe relativamente aos componentes com actividade estrogénica reconhecida que mais vulgarmente surgem nos efluentes domésticos sujeitos a tratamento primário. Apesar de não terem sido considerados neste trabalho factores como a carga orgânica e bacteriológica da água, e do número limitado de compostos incluídos na mistura, acreditamos, face a estudos descritos na bibliografia, que os compostos introduzidos naquela mistura serão os que mais contribuem para o potencial efeito estrogénico hipoteticamente associado ao efluente do emissário submarino da Guia.

Tal como nos trabalhos desenvolvidos por Barroso *et al.* (2002b), em que *N. reticulatus* expostos a 250ng Sn-TBT/L, apresentaram o desenvolvimento de imposex logo após um mês de exposição, no presente trabalho a exposição de fêmeas daquele gastrópode a 250 ng Sn-TBT/L durante 1 mês conduziu ao aumento dos valores dos índices de imposex em estudo, tendo sido significativa a variação registada para o índice FPL. De facto, são vários os estudos que referem a capacidade daquele composto na indução de imposex (Stroben *et al.*, 1992b; Bettin *et al.*, 1996; Pope, 1998; Barroso *et al.*, 2002b) actuando como disruptor endócrino androgénico e conduzindo à masculinização de fêmeas. O fenómeno de masculinização pode variar nas diferentes espécies de prosobrânquios mas existe uma linha comum na qual se reconhece o crescimento de um pénis e o desenvolvimento de um vaso deferente a par do tracto genital feminino (Matthiessen & Gibbs, 1998; Oberdörster & Cheek, 2001).

Nos tratamentos em que, juntamente com a solução de TBT, foi introduzida a mistura de compostos com actividade estrogénica (MCAE) verificou-se que, à medida que

a concentração da MCAE aumenta os valores dos parâmetros em estudo diminuem, embora esta variação não tenha sido significativa em nenhum dos tratamentos em estudo. Esta diminuição foi mais evidente relativamente ao comprimento de pénis das fêmeas e para o tratamento TBT + MCAE 50%. Após 30 dias de ensaio e para as concentrações testadas, os resultados obtidos não permitiram demonstrar qualquer efeito significativo da MCAE no desenvolvimento de imposex induzido pelo TBT. Contudo, não se pode excluir a possibilidade de existir uma tendência da MCAE em contrariar os efeitos de disrupção endócrina induzidos pelo TBT em *N. reticulatus* para períodos superiores a um mês e para concentrações mais elevadas de CAE.

Face aos resultados das experiências seria importante repetir os ensaios prolongando a sua duração e realizando análises químicas da água da e dos tecidos dos animais para se ter um controlo das concentrações efectivas de CAE e de TBT testadas. Seria ainda desejável que a renovação das soluções fosse realizada com maior frequência. De facto, não foi determinado neste trabalho a taxa de degradação dos compostos com actividade estrogénica ao longo do ensaio e, perante renovações semanais das soluções, não se pode excluir a possibilidade de ter ocorrido a degradação dos CAE impedindo a manutenção de concentrações constantes daqueles. Por outro lado, seria importante realizar ensaios envolvendo diluições do próprio efluente de forma a avaliar a sua influência no desenvolvimento de imposex e no gradiente de imposex observado nas imediações do emissário submarino da Guia.

6 - Bibliografia

Alda, J. L.; Barceló, D.; 2001. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius J. Anal. Chem.* 371: 437-447.

Barreiro R.; Gonzáles, R.; Quintela, M.; Ruiz, J. M.; 2001. Imposex, organotin bioaccumulation and sterile females in *Nassarius reticulatus* from polluted areas of NW Spain. *Marine Ecology Progress Series*. 218: 203-212.

Barroso, C. M.; Moreira, M. H.; 1998. Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implications for imposex studies. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 78: 1233-1246.

Barroso, C. M.; Moreira, M. H.; Gibbs, P. E.; 2000. Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a Southern Europe estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). *Mar Ecol Prog Ser*. 201:221-232.

Barroso, C. M.; 2001. Utilização do *imposex* na monitorização da poluição por TBT na costa portuguesa, dando especial relevo ao gastrópode *Nassarius (Hinia) reticulatus* (L.) – *Tese de Douturamento*. Universidade de Aveiro – Departamento de Biologia.

Barroso, C. M.; Moreira, M. H.; 2002. Spatial and temporal changes of TBT pollution along the Portuguese coast: inefficacy of the EEC directive 89/677. *Marine Pollution Bulletin*. 44: 480-486.

Barroso, C. M.; Moreira, M. H.; Bebian M.J.; 2002a. Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. *Marine Ecology Progress Series*. 230: 127-135.

Barroso, C. M.; Henriques, M. A.; Ferreira, M. S.; Moreira, M. H.; 2002b. The effectiveness of some compounds derived from antifouling paints in promoting imposex in *Nassarius reticulatus* (L.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 82: 249-255.

Bettin, C.; Oehlmann, J.; Stroben, E.; 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgoländer Meeresunters* 50: 299-317.

Blaber, S.J.M. 1970. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right

tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). Proceedings of the Malacological Society of London 39: 231-233

Boon J. P.; 2001. Action to demonstrate the harmful impact of TBT, effective communication strategies between policy makers and scientists in support of policy development (HIC_TBT). Final Report. Life 98 En/NL/000199.

Brian, J. V.; Harris, C. A.; Scholze, M.; Backhaus, T.; Booy, P.; Lamoree, M.; Pojana, G.; Jonkers, N.; Runnalls, T.; Bonfa, A.; Marcomini, A.; Sumpter, J. P.; 2005. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environmental Health Perspectives*. 113: 721-728.

Brzozowski, A. M.; Pike, A. C. W.; Dauter, Z.; Hubbard, R. E.; Bonn, T.; Engström, O. *et al.*; 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 389: 753-8.

Chapman, P. M.; 1986. Sediment quality criteria from the Sediment Quality Triad: an example. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 5: 957-964.

Chapman, P. M.; 1992. Pollution status of the North Sea sediments – an international integrative study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91: 253-264.

Chapman, P. M.; Paine, M. D.; Arthur, A. D.; Taylor, L. A.; 1996. A Triad Study of Sediment Quality Associated with a Major, Relatively Untreated Marine Sewage Discharge. *Marine Pollution Bulletin*. 32 (1): 47-64.

Clarke, K. R. 1990. Comparisons of dominance curves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 138: 143-157.

Clarke, K. R.; Gorley, R. N. 2001. PRIMER v5: User Manual/Tutorial. PRIMER-E. Plymouth.

Clarke, K. R.; Warwick, R. M.; 1994. Change in marine communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation. *Plymouth Marine Laboratory*. Plymouth.

Decreto de Lei n.º 152/97. Diário da República N.º 139 SÉRIE I-A de 19/06/1997.

DeFur, P. L.; Crane, M.; Ingersoll, C.; Tattersfield, L.; 1999. Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing, and Assessment. Florida. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).

Depledge, M. H.; Bilinghurst, Z.; 1999. Ecological Significance of Endocrine Disruption in Marine Invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*. 39 (1-12): 32-38.

Desbrow, C.; Routledge, E. J.; Brighty, G. C.; Sumpter, J. P.; Waldock, M.; 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in vitro Biological Screening. *Enviro. Sci. Technol.* 32 (11): 1549-1558.

Doeglas, D. J., 1968. Grain-size indices, classification and environment. *Sedimentology*. 10 : 8-82.

Fent, K.; Escher, C.; Caminada, D.; 2006. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Reproductive Toxicology*. 22: 175 – 185.

Féral C, LeGall; 1983. The influence of a pollutant factor (tributyltin) on the neuroendocrine mechanism responsible for the occurrence of a penis in the females of *Ocenebra erinacea*. In: Lever J and Boer HH (ed) Molluscan neuro-endocrinology. Proc Int Minisymph Molluscan Endocrinology (1982) North Holland Publ, Amsterdam.

Finet, Y.; Wüest, J.; Mareda, K.; 1992. Gastropods of Channel and Atlantic Ocean: Shells and Radulas. L'informatore Piceno. Ancona.

Fretter, V.; Graham, A.; 1984. The prosobranch molluscs of Britain and Denmark. Part 8 – Neogastropoda. *Journal of Molluscan Studies*. Supp. 15.

Fretter, V.; Graham, A.; 1994. British prosobranch molluscs, their functional anatomy and ecology. The Ray Society, Dorset Press, Dorset.

Gómez-Ariza, J. A.; Velasco, A.; Morales, E.; Giradles, I.; Santos, M.; ten Hallers-Tjabbes, C. C.; 1999. Study about the impact of TBT in the South West Coast of Spain. Occurrence of imposex in *Bolinus brandaris*. In MEPC 44/INF.11, submetida pela Espanha.

Graham, A. F. R. S.; 1988. Molluscs: Prosobranch and Pyramidellid Gastropods. The Linnean Society of London and The Estuarine and Brackish-water Sciences Association.

Grassle, J. G.; Grassle, J. P.; 1974. Opportunistic life histories and genetics systems in marine benthic polychaetes. *J. Mar. Res.* 32 (2): 253-284.

Halm, S.; Pounds, N.; Maddix, S.; Rand-weaver, M.; Sumpter, J. P.; Hutchinson, T. H.; Tyler, C. R.; 2002. Exposure to exogenous 17 β -oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicol.* 60: 285-299.

Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G.; 2003. Goodman & Gilman As

bases Farmacológicas da Terapêutica. 10.^a Ed.. McGraw-Hill. Rio de Janeiro.

Heidrich, D. D.; Steckelbroeck, S.; Klingmuller, D.; 2001. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids*. 66: 763–769.

[http:// www.biorede.pt](http://www.biorede.pt); acedido em 2 de Abril de 2007.

Hutchinson, T. H.; 2002. Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicology Letters*. 131: 75-81.

Ingersoll, C. G.; Dillon, T.; Biddinger, G. R.; 1997. Ecological Risk Assessment of Contaminated Sediments. SETAC Press – Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Pensacola.

Jobling, S.; Nolan, M.; Tyler, C. R.; Brighty, G.; Sumpter, J. P.; 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol*. 32: 2498–506.

Kajiwara, M.; Kuraku, S.; Kurokawa, T.; Kato, K.; Toda, S.; Hirose, H.; Takahashi, S.; Shibata, Y.; Iguchi, T.; Matsumoto, T.; Miyata, T.; Miura, T.; Takahashi, Y.; 2006. Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*. *Gen. Comp Endocrinol*. 148: 315–326.

Kavlock, R. J.; 1999. Overview of Endocrine Disruptor Research Activity in the United States. *Chemosphere*. 39 (8): 1227-1236.

Kinnberg, K.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P.; 2003. Effects of octylphenol and 17 β -estradiol on the gonads of guppies (*Poecilia reticulata*) exposed as adults via the water or as embryos via the mother. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 134: 45-55.

Kirk, L.; Tyler, C.; Lye, C.; Sumpter, J. ; 2002. Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works. *Environ. Toxicol. Chem*. 21 (5): 972–979.

Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T.; 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol*. 36 (6): 1202-1211.

Kristensen, E.; Andersen, F. O.; 1987. Determination of organic carbon in marine sediments: a comparison of two CHN-analyser methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 109, 15– 23.

Lamberson, J. O.; DeWitt, T. H.; Swartz, R. C.; 1992. Assessment of sediment toxicity to marine benthos. in: Burton, G. A., Jr. (ed). Sediment Toxicity Assessment.

Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.

Lambshead, P. J. D.; Platt, H. M.; Shaw, K. M.; 1983. The detection of differences among assemblages of marine benthic species based on an assessment of dominance and diversity. *Journal of Natural History*. 17: 859-874.

Larsson, D. G. J.; Adolfsson-Erici, M.; Parkkonen, J.; Pettersson, M.; Berg, A. H.; Olsson, P. E.; Förlin, L.; 1999. Ethinyloestradiol – an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*. 45: 91-97.

Legendre, L.; Legendre, P.; 1984. Ecologie numérique. 1. Le traitement multiple des données écologiques. Collection d'Écologie, n.º 12. Masson, Paris, 2^{ème} édition.

Leusch, F. D. L.; van den Heuvel, M. R.; Chapman, H. F.; Gooneratne, S. R.; Tremblay, L. A.; 2006. Development of in vitro methods for the extraction and quantification of estrogenic and androgenic activity of wastewater samples. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 143: 117–126.

Little, C. ; 2000. The Biology of Soft Shores and Estuaries. Oxford University Press. Oxford.

Long, E. R.; Chapman, P. M.; 1985. A sediment Quality Triad: Measures of Sediment Contamination, Toxicity and Infaunal Community Composition in Puget Sound. *Mar. Pol. Bulletin*. 16. (10): 405-415.

Lorphenri, O.; Intravijit, J.; Sabatini, D. A.; Kibbey, T. C. G.; Osathaphan, K.; Saiwan, C.; 2006. Sorption of acetaminophen, 17 α -ethynyl estradiol, nalidixic acid, and norfloxacin to silica, alumina, and a hydrophobic medium. *Water Research*. 40: 1481-1491.

Macleod, C. K.; Crawford, C. M.; Moltschaniwskyj, N. A.; 2004. Assessment of long term change in sediment condition after organic enrichment: defining recovery. *Marine Pollution Bulletin*. 49: 79–88.

Marecos, H.; Neves, R.; Matos, J. S.; 2001. A Beneficiação do Tratamento de Águas Residuais do Sistema de Saneamento da Costa do Estoril. I Congresso sobre planeamento e gestão do litoral dos países de expressão portuguesa – Problemas Actuais e Perspectivas Futuras. Ponta Delgada, Açores, 11-13 de Outubro.

Matthiessen, P.; Gibbs, P. E.; 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology Chemistry*. 17(1): 37-43.

Metcalf, Eddy; 1991. Wastewater Engineering. Treatment, Disposal and Reuse.

McGraw-Hill, United States.

Morabito, R.; Gianguzza, P.; Vizini, T.; Reas, G.; Nicolai, P.; Gianguzza, A.; ten Hallers-Tjabbes, C. C.; 1999. Impact of TBT off Sicily. *In* MEPC 44/INF.11, submetida pela Itália.

Nakamura, M.; Nagoya, H.; Hirai, T.; 2002. Nonylphenol induces complete feminization of the gonad in genetically controlled all-male amago salmon. *Fish Sci.* 68 (6): 1387–1389.

Nakari, T.; 2004. Estrogenicity of Municipal Effluents Assessed in Vivo and in Vitro. *Environ. Toxicol.* 19: 207-215.

Neves, R.; Marecos, H.; Santos, C.; Quintino, V.; Matos, J.; Zenha, H.; 2002. Integrated wastewater management in coastal areas: Wastewater treatment, environmental monitoring and performance optimization of Costa do Estoril system. 2nd international conference on marine waste water discharges 2002 - Istanbul sept. 16-20.

Oberdörster, E.; Cheek, O. A.; 2001. Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 20: 23-36.

Oberdörster, E.; McClellan-Green, P.; 2002. Mechanisms of imposex induction in the mud *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Marine Environmental Research.* 54: 715-718.

Oehlmann, J.; Stroben, E.; Schulte-Oehlmann, U.; Bauer, B.; 1998. Imposex development in response to TBT pollution in *Hinia incrassata* (Ström, 1768) (Prosobranchia, Stenoglossa). *Aquatic Toxicology.* 43: 239-260.

Örn, S.; Holbech, H.; Madsen, T. H.; Norrrgren, L.; Petersen, G.; 2003. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxic.* 65: 397-411.

Park, In-S.; Kim, J.-H.; Cho, S.H.; Kim, D.S.; 2004. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco*. *Aquaculture.* 232: 183-193.

Payne, J.; Rajapakse, N.; Wilkins, M.; Kortenkamp, A.; 2000. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 108, 983–987.

Pearson, T. H.; Rosenberg, R.; 1978. Macrobenthic succession in relation to

organic enrichment and pollution of the marine environment. *Ocenogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 16: 229-311.

Pearson, T. H.; Stanley, S. O.; 1979. Comparative measurement of the redox potential of marine sediments as a rapid means of assessing the effect of organic pollution. *Marine Biology*. 53, 371–379.

Pearson, T.H.; Duncan, G.; Nuttal, J. 1982. The Loch Eil project: Population fluctuations in the macrobentos. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 56: 305-321.

Pianka, E. R.; 1970. On a random selection. *Amer. Nat.* 104: 592-597.

Pope, N D.; 1998. The bioavailability of sediment-bound tributyltin (TBT). Ph.D.Thesis, University of Plymouth, 258 pp.

Power, E. A.; Munkittrick, K. R.; Chapman, P. M.; 1991. An ecological impact assessment framework for decision-making related to sediment quality. in: *Aquatic Toxicology and risk Assessment: Fourteenth Volume*, ASTM STP 1124, M. A. Mayes and M. G. Barron, Eds. American Society for Testing and Materials. Philadelphia.

Quinn, B.; Gagne, F.; Costello, M.; McKenzie, C. ; Wilson, J. ; Mothersill, C.; 2004. The endocrine disrupting effects of municipal effluent on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicol.* 66: 279-292.

Quintino, V.; Rodrigues, A. M.; Gentil, F.; 1989. Assessment of macrozoobenthic communities in the lagoon of Óbidos, western coast of Portugal. *Scientia Marina*. 53: 645-654.

Quintino, V.; Elliott, M.; Rodrigues, A. M.; 2006. The derivation, performance and role of univariate and multivariate indicators of benthic change: Case studies at differing spatial scales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 330: 368-382.

Rajapakse, N.; Silva, E.; Kortenkamp, A.; 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect-concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental Health Perspectives*. 110: 917-921.

Rato, M.; Sousa, A.; Quintã, R.; Langston, W.; Barroso, C. 2006. Assessment of Inshore/Offshore Tributyltin pollution Gradients in the Northwest Portugal Continental Shelf Using *Nassarius reticulatus* as a Bioindicator. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 25 (12): 3213-3220.

Robinson, C. D.; Brown, E.; Craft, J. A.; Davies, I. M.; Moffat, C. F.; Pirie, D.; Robertson, F.; Stagg, R. M.; Struthers, S.; 2003. Effects of sewage effluent and ethynyl

oestrafíol upon molecular markers of oestrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). *Aquatic Toxicol.* 62: 119-134.

Routledge E. J.; Sheahan, D.; Desbrow, C.; Brighty, G. C.; Waldock, M.; Sumpter, J. P.; 1998. Identification of estrogenic chemicals in STWeffluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol.* 32: 1559–65.

Santos, M. M.; Vieira, N.; Reis-Henriques, M. A.; Santos, A. M.; Gomes-Ariza, J.L.; Giraldez, I.; Ten Hallers-Tjabbes, C. C.; 2004. Imposex and butyltin contamination off the Oporto Coast (NW Portugal): a possible effect of the discharge of dredged material. *Environ. International.* 30: 793-798.

Shannon, C. E.; Weaver, W.; 1963. The Mathematical Theory of communication. University of Illinois Press. Urbana Illinois.

Silva, E.; Rajapakse, N.; Kortenkamp, A.; 2002. Something from ‘nothing’ - eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental Science and Technology.* 36: 1751-1756.

Silva, S.; Ré, A.; Pestana, P.; Rodrigues, A. M.; Quintino, V.; 2004. Sediment disturbance off Tagus Estuary, Western Portugal: chronic contamination, sewage outfall operation and runoff events. *Marine Pollution Bulletin.* 49: 154-162.

Smith, B.S. 1971. Sexuality in the American mud snail *Nassarius obsoletus* Say. Proceedings of the Malacological Society of London 39: 377-378.

Solé, M.; Barceló, D.; Porte, C.; 2002. Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxic.* 60: 233-248.

Solé, M.; Raldúa, D.; Barceló, D.; Porte, C.; 2003. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 56: 373-380.

Soto, A. M.; Justicia, H.; Wray, J. W.; Sonnenschein, C.; 1991. P-Nonylphenol, an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environ. Health Persp.* 92 (12): 167–173.

Sousa, A.; Mendo, S.; Barroso, C.; 2005. Imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. *Applied Organometallic Chemistry.* 19: 315-323.

Staples, C.; Mihaich, E.; Carbone, J.; Woodburn, K.; Klecka, G.; 2004. A weight

evidence analysis of the chronic ecotoxicity of nonylphenol atoxylates, nonylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 10 (6): 999–1017.

Stroben, E.; Oehlmann, J.; Fioroni, P.; 1992a. The Morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potencial indicator of tributyltin pollution. *Marine Biology*. 113: 625-636.

Stroben, E.; Oehlmann, J.; Fioroni, P.; 1992b. *Hinia reticulata* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropod tributyltin bioindicators. *Marine Biology*. 114: 289-296.

Sumpter, J.P.; Jobling, S.; 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103: 173–178.

Tabira, Y.; Nakai, M.; Asai, D.; Yakabe, Y.; Tahara, Y.; Shinmyozu, T.; Noguchi, M.; Takatsuki, M.; Shimohigashi, Y.; 1999. Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *Eur. J. Biochem.* 262 (1): 240–245.

Tallmark, B. 1980. Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda, Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. *Marine Ecology Progress. Series* 3: 51-62.

ten Hallers-Tjabbes C. C.; Kemp, J. F.; Boon, J. P.; 1994. Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North-Sea: relation to shipping traffic intensities. *Marine Pollution Bulletin*. 28: 311-313.

ten Hallers-Tjabbes, C. C.; Wegener, J-W.; van Hattum, B.; Kemp, J. F.; ten Hallers, E.; Reitsema, T. J.; Boon, J. P.; 2003. Imposex and organotin concentrations in *Buccinum undatum* and *Neptunea antiqua* from the North Sea: relationship to shipping density and hydrological conditions. *Marine Environmental Research*. 55: 203-233.

Ternes, T. A.; Kreckel, P.; Mueller, J.; 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The science of the Total Environment*. 225: 91-99.

Thornton, J. W.; Need, E.; Crews, D.; 2003. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signalling. *Science*. 301: 1714–1717.

Tilton, F.; Benson, W. H.; Schlenk, D.; 2002. Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input. *Aquat Toxicol.* 61: 211–24.

Tolls, J.; Kloeppersams, P.; Sijm, D.; 1994. Surfactant bioconcentration - a critical

review. *Chemosphere*. 29 (4): 693–717.

Trask, P. D., 1930. Mechanical analyses of sediments by centrifuge. *Econ. Geol.* 25: 58-99.

Van der Ven, K.; Keil, D.; Moens, L. N.; van Hummelen, P.; van Remortel, P.; Maras, M.; Coen, W.; 2006. Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: Molecular markers of endocrine disruption. *Chemosphere*. 65 (10): 1836-1845.

Versnoren, B. J.; Janssen, C.; 2004. Xenoestrogenic Effects of Ethinylestradiol in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 19: 198-206.

Voulvoulis, N.; Lester, J. N. ; 2006. Fate of organotins in sewage sludge during anaerobic digestion. *Science of the Total Environment*. 371: 373-382.

Warwick, R. M.; 1986. A new method for detecting pollution effects on marine macrobenthic communities. *Mar. Biol.* 92: 557-562.

Warwick, R. M.; Clark, K. R.; 1994. Relearn the ABC: taxonomic changes and abundance/biomass relationships in disturbed benthic communities. *Mar. Biol.* 118: 739-744.

Ying, G. G.; Kookana, R.S.; Ru, Y. J.; 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environmental International*. 28: 54.

ANEXOS

ANEXO 1

Revisão bibliográfica sobre concentrações de estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estriol, e nonilfenol presentes em influentes (Inf), efluentes (Efl) ou em águas de rio. Para cada estudo encontra-se referido o método de quantificação utilizado e, sempre que possível, o tipo de tratamento a que estão sujeitas as águas residuais em cada estação de tratamento.

Local	Caract. do influente	Tipo de tratat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1 (ng/L)	17 β -Estradiol E2 (ng/L)		Ethinilestradiol EE2 (ng/L)	Estríol E3 (ng/L)	Nonilfenol NP (ng/L)		Ref. Bibl.
Fucho; Tóquio; Japão	Águas residuais domésticas (0,6 milhões de pessoas)	Trat. primário (mecânico)Lamas activadas	21/05/99	GC-MS	Cméd	Cméd		n.e.	n.e.	Cméd	1	
			10/10/99		52,4	7,95				688		
			15/11/99		21,99	2,34				572,8		
Reino Unido	Águas residuais domésticas	Tratamento primário	15/05/95	GC-MS HPLC-MS	Cméd	Cméd		Cméd	n.e.	n.e.	2	
			17/05/95		41,67	39,67						
			22/05/95		7,53	5,07						
		Filtros de percloração e filtros de areia	17/07/95					7.0 \pm 3,7				
			24/07/95					n.d.				
			01/08/95					n.d.				
		Lamas activadas e lagoas de trata. terciário	17/07/95					n.d.				
			24/07/95		2,5	4,84		n.d.				
			01/08/95									
		Lamas activadas	17/07/95									
		Trat. primário, filtração biológica, trat. secundário	24/07/95		8,13	7,07		n.d.	n.e.	n.e.		
			01/08/95									
			28/11/95									
		Filtração biológica, lagoas de sedimentação	04/12/95		46,33	8,77		2,26				
			16/01/96									
		Filtração biológica, lagoas de sedimentação	30/11/95						n.e.	n.e.		
			04/12/95									
			15/01/95		9,36	4,87		0,53				

	arejamento	29/11/95 07/12/95 11/01/96	T. analítica	17,7	6,8	n.d.	Estriol E3 (ng/L)	Nonilfenol NP (ng/L)	Ref. Bibl.
Local	Caract. do influyente	Data de amostragem		Estrona E1 (ng/L)	17β-Estradiol E2 (ng/L)	Etimilestradiol EE2 (ng/L)			
Itália	Não referido	10/99-03/00	Não referido	Cmi	Cmi	Cmi	Cméd	n.e.	3
Holanda		10/97; 12/97		CM	CM	CM	CM		
Alemanha		11/97		82,1	0,44	<LOD	0,43		
Canadá		11/97		47	<0,1	<0,2	18		
R. Unido		05/95-01/96		70	<LOD	<LOD	-		
Japão		07/98-03/99		8	<LOD	<LOD	-		
USA		05/97; 10/97		76	2,7	<LOD	-		
Alemanha		06-10/00		-	<LOD	-	-		
USA	Águas residuais doméstic as, industriai s e agrícolas *	Tratamento primário *	HPLC- deteção por espectroscopia de fluoresc ou por RIA	-	32,30 36,60	2,42 7,59	-	22800 37000	4
		16/05/1997 08/10/1997			n.e. 4,77	n.e. n.d.		806±83 171	
		16/05/1997			6,56	2,48		1020	
		08/10/1997			9,05	3,57		590	

Local	Águas residuais domésticas (780 000 equivalentes de população)	Clarificação preliminar; Tratamento biológico por lamas activadas; Clarificação final	03-05/2002	LC-MS-MS	Influ			Eflu			Influ			Eflu			Influ			Eflu			5
					Cmin.	CMáx.	Cmédia	Cmin.	CMáx.	Cmédia	Cmin.	CMáx.	Cmédia	Cmin.	CMáx.	Cmédia	Cmin.	CMáx.	Cmédia	Cmin.	CMáx.	Cmédia	
Itália					15	5	10	3	n.d	n.d	23	n.d.	4194	1120			23	n.d.	4194	1120			
					60	30	31	8	n.d	n.d	48	1	8768	2235			48	1	8768	2235			
					35	16	25	6			31	1	6573	1649			31	1	6573	1649			

Local	Caract. do influente	Tipo de tratat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona			17β-Estradiol			Etimilestradiol			Estriol			Nonilfenol			Ref. Bibl.
					E1	(ng/L)	Cmin.	CMáx.	CMéd	E2	(ng/L)	EE2	(ng/L)	E3	(ng/L)	NP	(ng/L)			
Alemanha	Águas residuais domésticas	Clarificação preliminar; Arejamento em tanques; Clarificação final; eliminação de fosfatos por FeCl ₃ ou por FeCl ₂ ;	20-27/11/1997	GC-MS-MS	-		Cmin.	CMáx.	CMéd	-		Cmin.	CMáx.	CMéd	n.e.		n.e.			6
					70					3										
					9				n.d.			-	15	1						

Canadá	Águas residuais domésticas	Clarificação preliminar; Arejamento em tanques; Clarificação final; eliminação de fosfatos por sulfato de alumínio; desinfecção final por arcos de mercúrio ou por cloração ou por radiação UV	3-13/11/1997		- 48 3	- 64 6	- 42 9	n.e.	n.e.	
		Clarificação preliminar Tanque de arejamento ou passagem por "filtro biológico"; clarificação final	16-20/06/1997 23/06/1997							
Brasil	Águas residuais domésticas (624 000 e.q.)				- 40 -	- 21 -	-	n.e.	n.e.	

Local	Caract. do influente	Tipo de tratat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1 (ng/L)	17β-Estradiol E2 (ng/L)	Estimilestradiol EE2 (ng/L)	Estriol E3 (ng/L)	Nonilfenol NP (ng/L)	Ref. Bibl.
Bélgica	Águas residuais domésticas (95 000 e.p.) (Ch)	Lamas activadas; com zona anóxica; nitrificação; sem remoção específica de fósforo	Maio 2000	GC-MS (estrogénios) HPLC-espectroscopia de fluorescência	Cméd	Cméd	Cméd	n.e.	Cméd	7
					0,2	<0,6	n.d.		200	

	Aguas residuais domésticas (6500 e.p.) (Ev)	Lamas activadas em técnica de circulação oxidativa; com zona anóxica; nitrificação; sem remoção específica de fósforo	Jun/Jul 2000	(nonilfenol)	<0,2	<0,6	n.d.	170	
França	Aguas residuais domésticas (30 000 e.p.) (F1)	Lamas activadas; com zona anóxica; denitrificação; com remoção de fósforo	Maio 2001		5,0	2,3	n.d.	850	
	Aguas residuais domésticas (27 500 e.p.) (F2)	Lamas activadas; com zona anóxica;	Abril 2001		4,5	5,7	n.d.	1 140	

Local	Caract. do influente	Tipo de tratat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1 (ng/L)	17β-Estradiol E2 (ng/L)	Etimilestradiol EE2 (ng/L)	Estriol E3 (ng/L)	Nonilfenol NP (ng/L)	Ref. Bibl.
França	Aguas	Lamas activadas	Setembro 2000	GC-MS	Cméd	Cméd	Cméd	n.e.	n.e.	7

(cont.)	residuais domésticas (11 000 e.p.), de indústrias alimentares, destilarias e matadouros (F3)	em técnica de circulação oxidativa; com zona anóxica; nitrificação; sem remoção específica de fósforo		(estrogénios) HPLC-espectroscopia de fluorescência (nonilfenol)	0,5	<1	n.d.		(cont.)
Holanda	Aguas residuais domésticas (750 000 e.p.) (Ei)	Lamas activadas; com zona anóxica; nitrificação; com remoção de fósforo.	Setembro 1999		2,9	<1,1	n.d.	610	
	Aguas residuais domésticas (350 000 e.p.) (Am)	Lamas activadas; com zona anóxica; nitrificação; com remoção de fósforo.	Setembro 1999		3,8	<0,8	n.d.	430	
	Aguas residuais domésticas (320 000 e.p.) (Ko)	Filtragem por gotejamento; Lamas activadas; nitrificação	Outubro 1999		0,8	<0,9	n.d.	400	

Local	Caract. do influente	Tipo de trat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1 (ng/L)	17β-Estradiol E2 (ng/L)	Estimilestradiol EE2 (ng/L)	Estriol E3 (ng/L)	Nonilfenol NP (ng/L)	Ref. Bibl.
Alemanha	Aguas	Lamas activadas	Outubro 1999	GC-MS	Cméd	Cméd	Cméd		Cméd	7

a (cont.)	residuais domésticas (15 000 e.p.) (Xa)	em técnica de circulação oxidativa; remoção de fósforo		(estrogénios) HPLC- espectroscopia de fluorescência (nonilfenol)	4,5	<0,8	n.d.		210	(cont.)
Suíça	Águas residuais domésticas (110 000 e.p.) (Gl)	Lamas activadas; nitrificação; remoção de fósforo.	Outubro 1999		11	<0,8	n.d.		220	
	Águas residuais domésticas(27 000 e.p.) (Ro)	Lamas activadas; remoção de fósforo.	Setembro 1999		5,5	0,7	Cmáx. 2,8		1310	
	Águas residuais domésticas (38 000 e.p.) (Su)	Lamas activadas; com zona anóxica; nitrificação; com remoção de fósforo.	Outubro 2000		4,2	1,8	n.d.		150	
	Águas residuais domésticas (750 000 habitantes) (He)	Lamas activadas; com zona anóxica; nitrificação; remoção de fósforo.	Junho 1999		2,8	<0,8	1,1		540	

Local	Caract. do influyente	Tipo de tratat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1 (ng/L)	17β-Estradiol E2 (ng/L)	Etinilestradiol EE2 (ng/L)	Estriol E3 (ng/L)	Nonilfenol NP (ng/L)	Ref. Bibl.
-------	--------------------------	---------------------------------------	-----------------------	-----------------	-------------------------	-------------------------------	----------------------------------	-------------------------	----------------------------	---------------

Filândia (cont.)	Aguas residuais domésticas (25 000 habitantes) (Lo)	Lamas activadas; nitrificação; remoção de fósforo.	Maio 1999	GC-MS (estrogénios) HPLC- espectroscopia de fluorescência (nonilfenol)	Cméd	Cméd	Cméd	Cméd	7 (cont.)
					<0,3	<0,8	n.d.	130	
	Aguas residuais domest. (71 000 e.p.) (Suécia Ka)	Lamas activadas; com zona anóxica; nitrificação; remoção de fósforo.	Maio/Jun 1999		<0,3	<0,9	n.d.	50	
	Aguas residuais domest (431 000 habitantes) Noruega N1)	Filtros de arejamento sequenciais; zona anóxica; nitrificação.	Setembro 1999		3,0	<3,0	n.d.	n.e.	
Noruega Suécia	Aguas residuais domest (26 600 e.p.) (N2)	Tratamento químico primário; Remoção de fósforo.	Outubro 1999		35	13,0	n.d.	n.e.	

Local	Caract. do influyente	Tipo de tratat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1	17β-Estradiol E2	Estimilestradiol EE2	Estriol E3	Nonilfenol NP	Ref. Bibl.
-------	--------------------------	---------------------------------------	-----------------------	-----------------	---------------	---------------------	-------------------------	---------------	------------------	---------------

				(ng/L)				(ng/L)				(ng/L)				(ng/L)			
				Influent	Cmin.	CMáx.	Cmédia	Efluent	Cmin.	CMáx.	Cmédia	Influent	Cmin.	CMáx.	Cmédia	Influent	Cmin.	CMáx.	Cmédia
Canadá	Águas residuais domést (1 milhão hab.) e industriais	Não referido	Maio-Julho 2004	CG/MS				<1	3	22	9	<1	3	22	9	2720	320	25000	3210
Austrália	Águas residuais domésticas (1)	Lamas activadas	Julho 2003	CG/MS				Influent	Cmin.	CMáx.	Cmédia	Efluent	Cmin.	CMáx.	Cmédia	Infl.	Efluent	Cmin.	CMáx.
			Julho 2003					Cméd.				Cméd.				Cméd.			
								292	-	-	< LOD	-	-	-	-	2740	< LOQ	-	-
								67	-	-	13	-	-	-	-	1650	130	-	-
	Águas residuais domésticas (2)	Lamas activadas	Julho 2003					< LOD	-	-	< LOD	-	-	-	-	570	-	-	-
			Julho 2003					20	-	-	< LOD	-	-	-	-	360	-	-	-
	Águas residuais domésticas (3800 eq.pop.)	Lamas activadas	Agosto 2000					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Agosto 2002					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Julho 2003					28	-	-	< LOD	-	-	-	-	15300	n.e.	-	-

Local	Caract. do influente	Tipo de tratat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1	17β-Estradiol E2	Etinilestradiol EE2	Estriol E3	Nonilfenol NP	Ref. Bibl.
-------	----------------------	------------------------------------	--------------------	--------------	------------	------------------	---------------------	------------	---------------	------------

				(ng/L)		(ng/L)		(ng/L)		(ng/L)		(ng/L)		
				Influente Cméd.	Efluente Cméd.	Influente Cméd.	Efluente Cméd.	Influente Cméd.	Efluente Cméd.	Influente Cméd.	Efluente Cméd.	Influente Cméd.	Efluente Cméd.	
Austrália	Águas residuais domésticas (6000 hab.)	Lamas activadas	Julho 2003	79	-	< LOQ	-					7120	580	9 (cont.)
	Águas residuais domésticas (23000 eq.pop.)	Lamas activadas	Julho 2003	291	-	24	-					9730	-	
	Águas residuais domésticas (13000 eq.pop.)	Lamas activadas	Julho 2003	617	-	19	-			n.e.	n.e.	3750	-	
	Águas residuais domésticas e industriais (220000 hab.)	Lamas activadas	Agosto 2002	-	-	-	-					-	-	
			Julho 2003	302	-	< LOD	-					540	-	

Local	Caract. do influente	Tipo de tratat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1	17β-Estradiol E2	Etinilestradiol EE2	Estriol E3	Nonilfenol NP	Ref. Bibl.
-------	----------------------	------------------------------------	--------------------	--------------	------------	------------------	---------------------	------------	---------------	------------

					(ng/L)		(ng/L)		(ng/L)		
					Influente Cméd.	Efluente Cméd.			Influente Cméd.	Efluente Cméd.	
Austrália (cont.)	Águas residuais domésticas e industriais e biomédicas (contribuição inf. a 15% do total de influyente) (26000 hab.)	Lamas a ctivadas	Julho 2003	CG/MS	464	-	< LOD	-	1440	n.e.	n.e.
					220	-	8	-	10100	-	
					184	-	18	-	9400	-	
					150	-	23	-	12400	270	

Local	Caract. do influente	Tipo de tratat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1 (ng/L)		17β-Estradiol E2 (ng/L)		Etimilestradiol EE2 (ng/L)	Estriol E3 (ng/L)	Nonilfenol NP (ng/L)		Ref. Bibl.
Austrália (cont.)	Águas residuais domésticas e industriais (contribuição inf. a 15% do total de influente) (230000 eq. Pop.)	Lamas activadas	Julho 2003	CG/MS	Influente Cméd.	Efluente Cméd.	Influente Cméd.	Efluente Cméd.	n.e.	n.e.	Influente Cméd.	Efluente Cméd.	9 (cont.)
	Águas residuais domésticas (2200 hab.)												
			Filtragem por gotejamento	Junho 2003	585	< LOD	< LOD	< LOD			10200	< LOD	
Nova Zelândia	Águas residuais	-	-	CG/MS	Efluente < LOD		Efluente < LOD		Efluente < LOD	Efluente n.d.	-		10
	domésticas												
	Águas residuais domésticas	Tratamento por oxidação	-		19	< LOD	14,8	n.d.	n.d.				

Local	Caract. do influente	Tipo de trat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1 (ng/L)			17β-Estradiol E2 (ng/L)			Ethinilestradiol EE2 (ng/L)	Estríol E3 (ng/L)	Nonilfenol NP (ng/L)	Ref. Bibl.
Canadá	Águas residuais domésticas, industriais e comerciais	Acumulação e permanência em lagoas; Lamas activadas com ou sem filtração; Com ou sem processo de clarificação Primário; Processo de filtração intermédio	Out- Dez. 2002	CG/MS	Influente analisada 33 amostras	Efluente analisadas 31 amostras	Influente analisadas 34 amostras	Efluente analisadas 34 amostras						11
					CMédia CMáx	CMédia CMáx	CMédia CMáx	CMédia CMáx						
					29,5 48,7	7,6 38	8,3 13,9	- -						
Itália	Águas residuais domésticas	Clarificação primária Lamas activadas Clarificação final	Maio-Março 2002	LC/ MS-MS	Inl	Efl	Rio	Inl	Efl	Rio	Inl	Efl	Rio	12
					Cmin.	Cmin.	Cmin.	Cmin.	Cmin.	Cmin.	Cmin.	Cmin.		
					CMáx	CMáx	CMáx	CMáx	CMáx	CMáx	CMáx	CMáx		
					CMéd	CMéd	CMéd	CMéd	CMéd	CMéd	CMéd	CMéd		
	15 60 35	5 30 16	5 12 8	3 8 6	2 4	n.d 1 -	23 48 31	n.d 1 -	2 5 1	4194 1120 1289 8768 2235 1466 6573 1649 1364				
Canadá	Águas residuais domésticas e industriais	Estudadas 18 estações de tratamento de águas residuais	Set.1998 Fev.1999	CG/MS	Infl	Efl	Infl	Efl	-	-	-	-	13	
					Cmin.	Cmin.	Cmin.	Cmin.						
					CMáx	CMáx	CMáx	CMáx						
					CMéd	CMéd	CMéd	CMéd						

		com diferentes tipos de tratamentos				49	17	15.6	1.8				
						78	96	26.0	14.7				
						19	1	2.4	0.2				
Local	Caract. do influente	Tipo de tratat. de águas residuais	Data de amostragem	T. analítica	Estrona E1 (ng/L)	17β-Estradiol E2 (ng/L)	Etimilestradiol EE2 (ng/L)	Estriol E3 (ng/L)	Nonilfenol NP (ng/L)	Ref. Bibl.			
Espanha	Águas residuais domésticas	-	Abril-Junho 1999	HPLC/ MS	Efluente			Infl	Efl.	Infl	Efl.		
	Águas residuais domésticas e ind. Plásticos				<LOD	<LOD	<LOD	261	-	131	6		
	Águas residuais domésticas, industriais							-	-	343	142		
								263	-	40	289		

Legenda:

Relativamente à referência 8 da tabela, o trabalho envolveu o estudo de 8 estações de tratamento de águas residuais.

Relativamente à referência 9 da tabela: Estrogénios: Limite de detecção: 1 ng/L; Limite de Quantificação: 5 ng/L; Nonilfenol: Limite de detecção: 10 ng/L; Limite de Quantificação: 50ng/L.

Relativamente à referência 11 da tabela: LOD: 5 ng/L Estrona/ Estradiol.

Abreviaturas: CG-MS: cromatografia gasosa associada a espectroscopia de Massa; n.e.: não estudada; HPLC-MS: HPLC associada a espectroscopia de Massa; n.d.: composto não foi detectado; < LOD: valores inferiores ao Limite de Detecção do método; LC-MS-MS:

Cromatografia Líquida associada a espectroscopia de Massa com duas interfaces diferentes (APCI e Electrospray); < LOQ: valores inferiores ao limite de quantificação.

Referências bibliográficas

- 1- Nakada, N.; Nyunoya, H.; Nakamura, M., A.; Iguchi, T.; Takada, H.; 2004. Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem. Vol. 23. n° 12*, 2807-2815.
- 2- Desbrow, C.; Routledge, E.J.; Brighty, G.C.; Sumpter, J.P.; Waldock, M.; 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in vitro Biological Screening. *Environ. Sci. Technol.* 32 (11): 1549-1558.
- 3- Ying, G.-G.; Kookana, R.S.; Ru, Y.-J.; 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environmental Internacional.* 28:545-551.
- 4- Snyder, S.A.; Keith, T.L., Verbrugge, D.A.; Snyder, E.M., Gross, T.S., Kannan, K.; Giesy, J.P.; 1999. Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 33 (16): 2814-2820.
- 5- Laganà, A.; Bacaloni, A.; De Leva, I.; Faberi, A.; Fago, G.; Marino, A.; 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta.* 501: 79-88.
- 6- Ternes, T.A.; Stumpf, M.; Mueller, J.; Haberer, K.; Wilken, R.D.; Servos, M.; 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The science of the Total Environment.* 225: 81-90.
- 7- Johnson, A.C.; Aerni, H.R.; Gerritsen, A.; Gibert, M.; Giger, W.; Hylland, K.; Jürgens, M.; Nakari, T.; Pickering A.; Suter, M.J.-F.; Svenson, A.; Wettstein, F.E.; 2005. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research.* 39: 47-58.
- 8- Lee, H.-B; Peart, T.E.; Svoboda, M.L. 2005. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1094: 122–129.
- 9- Leusch, F. D.L.; Chapman, H.F.; Heuvel, M.R.; Tan, B.L.L.; Gooneratne, S.R.; Tremblay, L.A. 2006. Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 403–41.
- 10- Sarmah, A.K.; Northcott, G.L.; Leusch, F.D.L.; Tremblay, L.A. 2006. A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand. *Science of the Total Environment.* 355: 135– 144.

- 11- Lishman, L.; Smyth, S.A.; Sarafin, K.; Kleywegt, S.; Toito, J.; Peart, T.; Lee, B.; Servos, M.; Beland, M.; Seto, P. 2006. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of the Total Environment* 367: 544–558.
- 12- Laganà, A.; Bacaloni, A.; De Leva, I. Faberi, A.; Fago, G.; Marino, A. 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta* 501: 79–88.
- 13- Servos, M.R.; Bennie, D.T.; Burnison, B.K.; Jurkovic, A.; McInnis, R.; Neheli, T.; Schnell, A.; Seto, P.; Smyth, S.A.; Ternes, T.A. (2005). Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment* 336: 155– 170.
- 14- Sole, M.; Lopez de Alda, M.J.; Castillo, M.; Porte, C.; Ladergaard-Pedersen, K.; Barceló, D. 2000. Estrogenicity Determination in Sewage Treatment Plants and Surface Waters from the Catalanian Area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.* 34: 5076-5083.

Anexo 2

Bibliografia utilizada na identificação da Macrofauna Bentónica

Chambers, S.J., Muir, A. I., 1997. Polychaetes: British Chrysopetaloidea, Pisonoidea and Aphroditoidea. Synopses of the British Fauna (New series) n.º 54. Eds. Kermack, D.M., Barnes, R.S.K. The Linnean Society of London and the Estuarine and Coastal Sciences Association.

Fauchald, K., 1977. The Polychaete Worms Definitions and keys to the orders, families and genera. Ed. R. E. Ostermeyer. Natural History of Los Angeles County, Science Series. Los Angeles.

Fauvel, P., 1923. Faune de France 5 : Polychètes errantes. Lechavelier. Paris.

Fauvel, P., 1927. Faune de France 16: Polychètes sédentaires. Lechavelier. Paris.

George, J.D., Hartmann-Schröder, G., 1985. Polychaetes: British Amphinomida, Spintherida & Eunicida. Synopses of the British Fauna (New series) n.º 32. Eds. Kermack, D.M., Barnes, R.S.K. The Linnean Society of London and the Estuarine and Coastal Sciences Association.

Graham, A. 1971. British Prosobranchs. Synopsis of the British fauna, n.º 2. Academic Press.

Holthe, T., 1986. Polychaeta Terebellomorpha. Norwegian University Press. Oslo.

Lincoln, R.J. 1979. British Marine Amphipoda: Gammaridea, Vol. I, II and III. British Museum Natural History. London.

Macedo, M. C. C., Macedo, M. I. C., Borges, J. P., 1999. Conchas Marinhas de Portugal. Editorial Verbo. Lisboa.

Pleijel, F. Dales, R.P., 1991. Polychaetes: British Phyllodoceideans, Typhloscolecoideans and Tomopteroideans. Synopses of the British Fauna (New series) n.º 45. Eds. Kermack, D.M., Barnes, R.S.K. The Linnean Society of London and the Estuarine and Coastal Sciences Association.

Tebble, N., 1976. British Bivalve Seashells – A handbook for Identification, 2nd ed., Royal Scottish Museum. Edinburgh.

Tortonese, E. 1965. Fauna D' Itália. Equinodermata. Edizioni Calderini Bologna.

Anexo 3

Dados relativos ao estudo da incidência de Imposex em *Nassarius reticulatus* ao longo de um gradiente antropogénico de enriquecimento orgânico em meio marinho costeiro.

Tabela 2.1 – Dados relativos aos machos observados durante o estudo da incidência de Imposex em *Nassarius reticulatus* ao longo de um gradiente antropogénico de enriquecimento orgânico em meio marinho costeiro. s – desvio padrão; PM –comprimento de pênis dos machos; N.º machos – número de machos observados.

Machos						
Amostra		Altura Concha (mm)		PM (mm)		N.º machos
		Média	s	Média	s	
L1	L1.1	25,97	1,89	11,25	1,71	20
	L1.2	26,69	1,45	9,95	1,39	20
	L1.3	23,68	1,65	10,24	1,16	34
	L1.4	26,76	1,46	10,90	1,07	20
L2	L2.1	27,08	2,06	11,05	0,85	19
	L2.2	27,16	1,69	10,20	1,32	20
	L2.3	27,09	1,65	10,40	1,19	20
	L2.4	26,93	1,78	10,27	1,80	26
L3	L3.1	26,72	2,09	10,52	2,22	25
	L3.2	25,66	2,06	10,26	1,41	31
	L3.3	24,38	1,43	10,02	1,70	13
	L3.4	27,38	1,77	10,52	1,56	56

Tabela 2.2 – Dados relativos às fêmeas observadas durante o estudo da incidência de Imposex em *Nassarius reticulatus* ao longo de um gradiente antropogénico de enriquecimento orgânico em meio marinho costeiro (s: desvio padrão; N.º F: N.º de fêmeas observadas; N. F Imp: N.º de fêmeas afectadas por imposex; % I: percentagem de fêmeas afectadas VDSI: Índice de sequência do vaso deferente; FPL: comprimento de pénis nas fêmeas; RPLI: índice do comprimento relativo do pénis das fêmeas na réplica).

Fêmeas											
Amostra		Altura Concha (mm)		N.º F	N. F Imp	% I	VDSI		FPL		RPLI
		Média	s				Média	s	Média	s	
L1	L1.1	28,43	1,82	40	17	42,50	0,43	0,50	0,108	0,293	0,96
	L1.2	27,06	4,51	40	16	40,00	0,45	0,64	0,096	0,280	0,96
	L1.3	26,43	2,26	26	9	34,62	0,35	0,49	0,003	0,005	0,03
	L1.4	28,27	1,48	40	18	45,00	0,45	0,50	0,167	0,331	1,53
L2	L2.1	29,00	1,72	48	25	52,08	0,52	0,50	0,086	0,221	0,76
	L2.2	28,80	3,56	40	18	45,00	0,50	0,64	0,105	0,316	1,03
	L2.3	28,34	1,79	40	18	45,00	0,45	0,50	0,032	0,127	0,31
	L2.4	28,17	2,55	34	13	38,24	0,38	0,49	0,024	0,119	0,24
L3	L3.1	29,22	1,85	64	46	71,86	0,69	0,47	0,074	0,235	0,70
	L3.2	27,62	1,63	35	24	68,57	0,90	0,72	0,146	0,368	1,43
	L3.3	27,69	2,13	29	22	75,86	0,94	0,97	0,120	0,266	1,20
	L3.4	28,51	2,07	17	11	64,71	0,84	0,71	0,156	0,346	1,48

Tabela 2.3 Valor médio dos parâmetros caracterizadores de imposex, em cada local de amostragem (s: desvio padrão; VDSI: índice de sequência do vaso deferente; FPL: comprimento de pénis nas fêmeas; RPLI: índice do comprimento relativo do pénis das fêmeas na réplica; % I: percentagem de fêmeas afectadas).

Local de amostragem	VDSI		FPL		RPLI		% I	
	Média	s	Média	s	Média	s	Média	s
L1	0,418	0,05	0,093	0,067	0,871	0,62	40,53	4,44
L2	0,463	0,06	0,062	0,040	0,587	0,38	45,08	5,65
L3	0,842	0,20	0,124	0,064	1,203	0,36	70,25	4,75